

# Untersuchungen zu den genetischen Ursachen der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD)



## **Kumulative Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –

Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Lars Fritsche**

aus Lindau (Bodensee)

April 2009

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2005 bis April 2009 am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg unter der Anleitung von Herr Prof. Dr. Bernhard Weber.

Promotionsgesuch eingereicht am: 14. April 2009

Promotionskolloquium am: 22. Oktober 2009

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. Herbert Tschochner
	Erstgutachter:	Prof. Dr. Charalampos Aslanidis
	Zweitgutachter:	Prof. Dr. Bernhard H.F. Weber
	Dritter Prüfer:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly

*Meinen Eltern*



*„Sicher ist, dass nichts sicher ist. Selbst das nicht.“*

(Joachim Ringelnatz, 1883 – 1934)

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Klinik der AMD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Epidemiologie der AMD .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Die Genetik der AMD .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit.....</b>	<b>5</b>
<b>2 PROBANDEN UND METHODEN.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Fall-Kontroll-Studien .....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Unterfränkische AMD-Fall-Kontroll-Studie .....	6
2.1.2 Deutsche Replikationsstudie .....	7
2.1.3 Nowgorodskaya-Oblast-Isolat (Russland).....	7
2.1.4 Bonner AMD-Studie .....	7
<b>2.2 Sequenzanalysen und SNP-Genotypisierungen.....</b>	<b>7</b>
2.2.1 DNA-Sequenzierung mittels Fluoreszenzkapillarsequenzierung .....	7
2.2.2 SNP-Genotypisierung mittels MALDI-TOF .....	8
2.2.3 Allelische Diskriminierungs-Assays .....	8
<b>2.3 Statistische Analysen .....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht .....	9
2.3.2 SNP Analyse .....	9
2.3.3 LD-Berechnung.....	10
2.3.4 Haplotypanalyse .....	11
2.3.5 Verwendete statistische Software-Programme.....	12
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Das Kandidatengen <i>APOE</i> (Fritsche <i>et al.</i> 2009).....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Das Kandidatengen <i>HMCN1</i> (Fisher <i>et al.</i> 2007) .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Replikationsstudien des <i>International AMD Genetics Consortiums</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Untersuchungen zur Kandidatenregion 10q23.33–10qter (Rivera <i>et al.</i> 2005; Fisher <i>et al.</i> 2007; Fritsche <i>et al.</i> 2008).....</b>	<b>25</b>
<b>3.5 Funktionelle Untersuchungen zu AMD-Kandidatengenen .....</b>	<b>31</b>
3.5.1 <i>ARMS2</i> (Rivera <i>et al.</i> 2005; Fritsche <i>et al.</i> 2008).....	31
3.5.2 Komplementfaktoren und -komponenten (Skerka <i>et al.</i> 2007; Scholl <i>et al.</i> 2008) .....	34
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Die Suche nach kausalen AMD-assoziierten Varianten .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 AMD – Ein Sonderfall unter den komplexen Erkrankungen? .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Genetische Testung für AMD .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 AMD-Therapie .....</b>	<b>42</b>

4.5	Ausblick .....	43
5	LITERATURVERZEICHNIS .....	45
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	54
7	SUMMARY.....	56
8	LEBENS LAUF .....	58
9	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....	59
9.1	Publikationen .....	59
9.1.1	Erstautorenschaften .....	59
9.1.2	Koautorenschaften.....	59
9.1.3	Patente .....	60
9.2	Kongressbeiträge.....	61
9.2.1	Vorträge .....	61
9.2.2	Poster.....	62
10	ANHANG .....	63

## Abkürzungsverzeichnis

AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
APOE	Apolipoprotein E
ARM	<i>Age-related maculopathy</i>
ARMS2	<i>Age-related maculopathy susceptibility 2</i>
C10orf87	<i>Chromosome 10 open reading frame 87</i>
C2	<i>Complement component 2</i>
C3	<i>Complement component 3</i>
C5	<i>Complement component 5</i>
CFB	<i>Complement factor B</i>
CFH	<i>Complement factor H</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CNV	Choroidale Neovaskularisation
CRP	<i>C-reactive protein</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FHL-1	<i>Factor H-like protein 1</i>
GA	Geographische Atrophie
HMCN1	Hemicentin 1
HTRA1	<i>High-temperature requirement protein A1</i>
KHK	Koronare Herzerkrankung
LD	<i>Linkage disequilibrium</i> ; Kopplungsungleichgewicht
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MALDITOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> ; Boten-RNA
MS	<i>Mass spectrometry</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
OR	<i>Odds ratio</i> ; Quotenverhältnis
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLEKHA1	<i>Pleckstrin homology domain containing, family A member 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
SCR	<i>Short consensus repeat</i>
SERPING1	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelnukleotidpolymorphismus
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>

# 1 Einleitung

Vor noch gut 200 Jahren wurden Infektionskrankheiten als die „Geißel der Menschheit“ angesehen, doch Dank enormer Fortschritte unseres Lebensstandards, insbesondere in den Bereichen der Hygiene, der Medizin und der Ernährung, gelang es diese Erkrankungen in den westlichen Industrienationen weitgehend einzudämmen (MacKeown 1976). Damit einhergehend stiegen dort neben den Bevölkerungszahlen auch die durchschnittliche Lebenserwartung und dementsprechend der Anteil der bis dahin relativ seltenen altersabhängigen Erkrankungen. Unter diesen Erkrankungen findet sich neben den altersbedingten Formen von Herz-Kreislaufkrankungen, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Arthrose und zahlreichen weiteren, auch die altersabhängige Makuladegeneration (AMD). All diese Krankheiten haben gemein, dass sie komplex sind, d.h. dass neben dem Alter auch umweltbedingte und genetische Faktoren das Krankheitsrisiko beeinflussen. Da die Aufklärung dieser Risikofaktoren nicht nur ein allgemeines Verständnis der Ätiologie erlaubt, sondern zugleich Voraussetzung für die Entwicklung gezielter Interventionsformen ist, stellt sie in einem nächsten logischen Schritt eine entscheidende Grundlage für eine bis ins hohe Alter angestrebte maximale Lebensqualität dar.

Die vorliegende Dissertation soll am Beispiel der AMD einen Einblick in die genetischen Untersuchungsansätze von komplexen Erkrankungen liefern und die dabei erarbeiteten, neuen Erkenntnisse zur Genetik der AMD aufzeigen.

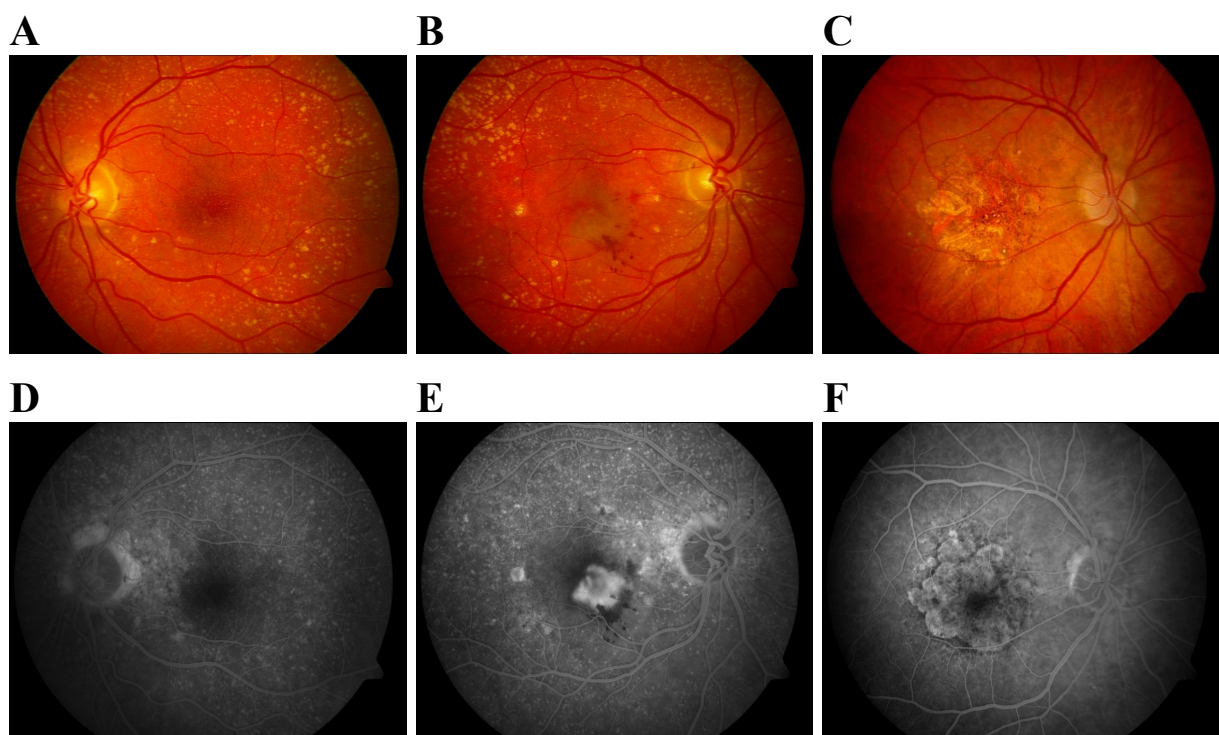
## 1.1 Klinik der AMD

Die AMD ist eine Erkrankung des Aderhaut-/Netzhautbereiches, die in den westlichen Industrienationen als eine der häufigsten Ursachen gesetzlich anerkannter Blindheit gilt (Gehrs *et al.* 2006). Eine progrediente Degeneration der Makula, dem zentralen Bereich der Netzhaut mit der größten Dichte von Zapfen-Photorezeptoren führt zu einem Verlust des zentralen Visus und somit zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität von Betroffenen.

Kennzeichen von frühen Stadien der AMD, die ab einem Alter von etwa 50 Jahren beobachtet werden können, sind sogenannte Drusenbildungen in der Bruchschen Membran, eigelbfarbige Ablagerungen, bestehend aus extrazellulärem Material, das auch Lipofuszin genannt werden. Lipofuszin ist hierbei ein Sammelbegriff für unlösliche, intrazelluläre Ansammlungen hochgradig oxidierten Proteine und Lipide, deren Umfang und Häufigkeit



mit zunehmendem Alter ansteigen und welche unter dem Verdacht stehen zytotoxisch zu sein (Brunk and Terman 2002). Wenige kleine Drusen ( $< 63 \mu\text{m}$ ) finden sich als eine übliche Form der alternden Netzhaut, wohingegen größere Drusen ( $\geq 63 \mu\text{m}$ ) als ein Frühstadium der AMD angesehen und als altersbedingte Makulopathie (*age-related maculopathy*, ARM) bezeichnet werden (Abb. 1A,D). Personen mit ARM zeigen in der Regel keine Beeinträchtigung des Gesichtsfeldes, besitzen jedoch ein vielfach erhöhtes Risiko, an einem Spätstadium der AMD zu erkranken, welches dann von einem gravierenden Visusverlust begleitet sein kann.



**Abbildung 1:** Aufnahmen des Augenhintergrunds von drei nicht-verwandten AMD-Patienten. Die Makula ist jeweils zentral als leicht dunkler Bereich zu erkennen. **A–C** Fundusbilder; **D–F** Fluoreszenzangiographie. **A,D** Altersbedingte Makulopathie mit Drusen (gelbliche Ablagerungen in der Peripherie). **B,E** Choroidale Neovaskularisation. **C,F** Geographische Atrophie im Bereich der Makula. (Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Claudia von Strachwitz, Universitäts-Augenklinik Würzburg).

Bei den AMD-Spätstadien lassen sich zunächst zwei Gruppen unterscheiden, die choroidale Neovaskularisation (CNV) oder „feuchte“ AMD und die geographische Atrophie (GA) oder „trockene“ AMD. Bei der CNV kommt es zum unkontrollierten Einwachsen von Blutgefäßen aus der Choroidea unter das retinale Pigmentepithel (RPE). Diese neugebildeten Blutgefäße vereinigen sich, können lecken und so Flüssigkeitsansammlungen

unter dem RPE verursachen, die zu einer Abhebung und schließlich zum Absterben der angrenzenden RPE- und Photorezeptor-Zellen führen (Abbildung 1B,E).

Die häufiger vorkommende „trockene“ AMD zeichnet sich im Gegensatz dazu durch einen großflächigen, atrophischen Verlust der Choroidea und des RPE aus, was letztendlich ebenfalls zum Absterben der darüberliegenden Photorezeptorzellen führt (Abb. 1C,F).

## 1.2 Epidemiologie der AMD

Als komplexe Erkrankung zeichnet sich die AMD durch demographische, umweltbedingte und genetische Risikofaktoren aus. Wie bereits der Name andeutet, nimmt das Risiko an AMD zu erkranken mit fortschreitendem Alter zu. So leiden z.B. in der Europäischen Union bereits ca. 3,3 % der Personen über 65 Jahren an den Spätformen der AMD, während der Anteil in der Personengruppe ab 80 Jahren sogar auf über 12 % geschätzt wird (Augood *et al.* 2006). Da demographische Schätzungen davon ausgehen, dass immer mehr Menschen ein höheres Alter erreichen werden, ist anzunehmen, dass auch der Anteil der AMD-Patienten in Zukunft deutlich zunehmen wird.

Ähnlich zu anderen altersabhängigen Erkrankungen, wie z.B. der koronaren Herzerkrankung oder dem Morbus Alzheimer, wird der Einfluss von zahlreichen Faktoren (Übergewicht, Blut-Cholesterinspiegel, Alkohol- oder Zigarettenkonsum) auf das AMD-Risiko diskutiert. Bisher konnte jedoch nur das Rauchen mit einem zwei- bis dreifach erhöhten Risiko als umweltabhängiger Risikofaktor in mehreren Studien unabhängig repliziert werden (Tomany *et al.* 2004). Daneben gibt es Hinweise, dass sowohl die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln (wie z.B. Zink, Vitamine A, B, C, Lutein oder Zeaxanthin) als auch die Vermeidung von starker Sonnenlichtexposition einen positiven Einfluss auf den Verlauf der AMD haben könnten (Fletcher *et al.* 2008).

## 1.3 Die Genetik der AMD

Heritabilität der AMD wurde bereits 1994 anhand von Zwillingsstudien und familiären Häufungen gezeigt (Klein *et al.* 1994; Silvestri *et al.* 1994). Sie wird heute auf 46–71 % geschätzt (Seddon *et al.* 2005). Es ließ sich jedoch kein eindeutiges Vererbungsmuster erkennen, was vor dem Hintergrund zu verstehen ist, dass die AMD als komplexe Erkrankung von mehreren, eventuell voneinander unabhängigen, Risikofaktoren verursacht wird. Es wird angenommen, dass verschiedene Kombinationen von Risikofaktoren wirken müssen, um eine kritische Schwelle zu erreichen, die letztendlich AMD-Pathologie initiiert. Hierbei scheint jedoch nicht ein einzelner Faktor ausreichend bzw. hinreichend zu sein.

Außerdem können sich die jeweiligen Faktoren durchaus in ihrer Penetranz und Häufigkeit unterscheiden.

Anfänglich waren genetische Untersuchungen zur AMD hauptsächlich durch Kandidatengenstudien geprägt, da genomweite, familien-basierte Kopplungsanalysen vor dem Hintergrund des späten Auftretens der AMD und der einhergehenden Schwierigkeiten große Familien-Stammbäume zu rekrutieren, zunächst nicht realisierbar schienen. Die damit verbundene Einschränkung, nur solche Gene bzw. Genvarianten zu untersuchen, die dem vorhandenen Wissensstand zur AMD-Ätiologie funktionell genügten, waren jedoch nur mit einigen wenigen Ausnahmen erfolgreich (Haddad *et al.* 2006). Nichtsdestotrotz besitzen solche Kandidatengenstudien auch heute noch für die AMD-Forschung eine große Bedeutung, da diese es erlauben, selbst relativ kleine Effekte aufzuspüren. Diese spielen zwar dementsprechend für das allgemeine Krankheitsrisiko in der Bevölkerung eine eher untergeordnete Rolle, können aber sehr wohl wertvolle Erkenntnisse über pathologische Prozesse bei der AMD liefern.

Die größte Problematik einer schwachen genetischen Assoziation besteht in deren Replikation. Denn diese erfordert ausreichend große Studienpopulationen, um eine möglicherweise zunächst überschätzte Assoziation (ein Phänomen, das unter dem Terminus „*winner's curse*“ bekannt ist) mit genügender Aussagekraft bestätigen zu können (Lohmueller *et al.* 2003). So gibt es für die AMD eine Vielzahl von möglichen AMD-Suszeptibilitätsgenen, die bisher jedoch nicht zufriedenstellend verifiziert bzw. in vielen Fällen falsifiziert wurden (Haddad *et al.* 2006).

Mit der *Post-Human Genome Project*-Ära (Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001) bzw. der *Post-HAPMAP Project*-Ära (2005) änderten sich entscheidend die Voraussetzungen für genetische Untersuchungen von komplexen Erkrankungen. Nun standen Datenbanken zur Verfügung, die zuverlässige Informationen über Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) des menschlichen Genoms enthielten. Anhand der bekannten Populationshäufigkeiten und gegebenenfalls vorliegenden Kopplungsungleichgewichten (*linkage disequilibrium*, LD) von Markern konnten nun

[illegible][illegible]

re neue Technologien erlaubten eine relativ kostengünstige und parallele Analyse von hunderten bis hundert-tausenden von SNPs. Somit konnte man ohne Vorwissen großflächig

Vorwissen großflächig Kandidatenregionen oder sogar das gesamte menschliche Genom mit relativ dichter Abdeckung von bekannten SNPs auf Assoziationen untersuchen.

Die seit 1998 durchgeführten Familien-basierten AMD-Kopplungsanalysen zeigten bereits einige Kandidatenregionen auf, die jedoch zumeist große chromosomale Bereiche umfassten und nur mit wenigen Ausnahmen replizierbare Ergebnisse lieferten (Klein *et al.* 1998; Weeks *et al.* 2000; Weeks *et al.* 2001; Majewski *et al.* 2003; Schick *et al.* 2003; Seddon *et al.* 2003; Iyengar *et al.* 2004; Kenealy *et al.* 2004; Weeks *et al.* 2004). Eine Meta-Analyse, die sechs der insgesamt neun veröffentlichten Kopplungsstudien einschloss, konnte auf sieben vielversprechende Chromosomenabschnitte mit genomweiter (10q23.33–10qter) bzw. chromosomenweiter Signifikanz (1q23.3–q31.1, 2p23.2–p16.2, 3p22.1–p14.1, 4q28.3–q32.1, 12q23.2–q24.31, und 16p13–q23.1) hinweisen (Fisher *et al.* 2005).

Die chromosomale Region 1q23.3–q31.1 zeigte sich hierbei als robuste, wenn auch nicht als signifikanteste Kandidatenregion, weshalb dessen Feinkartierung von einigen Gruppen favorisiert wurde. Dies führte 2005 dazu, dass eine genomweite Assoziationsstudie und drei SNP-Feinkartierungen das Risiko-tragende Gen auf Chromosom 1q31, nämlich das Komplementfaktor H-Gen (*complement factor H*; *CFH*), identifizieren konnten (Edwards *et al.* 2005; Hageman *et al.* 2005; Haines *et al.* 2005; Klein *et al.* 2005). Die beobachteten Häufigkeiten und Effektstärken der gefundenen Risikovarianten markierten *CFH* als ein erstes hauptverantwortliches Suszeptibilitätsgen der AMD.

#### **1.4 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit**

Hauptziel dieser Arbeit war es, Untersuchungen zu genetischen Faktoren mit einem Beitrag zur AMD-Ätiologie durchzuführen. Die dazu erstellten, eigenen Arbeiten werden im Nachfolgenden zusammenfassend vorgestellt und beinhalten Untersuchungen zu den funktionellen bzw. positionellen Kandidatengenen *APOE* (Apolipoprotein E) und *HMCN1* (Hemicentin 1), eine negative Replikation von zwei Kandidatengenen, sowie die Charakterisierung der Kandidatenregion von Chromosom 10q23.33–10qter. Des Weiteren werden die Ergebnisse zur systemischen Komplementaktivierung in AMD-Patienten, sowie zu den funktionellen Auswirkungen der eventuell funktionellen Variante des *CFH*-Gens, die jeweils im Rahmen von Kooperationen erarbeitet wurden, erläutert.

## 2 Probanden und Methoden

### 2.1 Fall-Kontroll-Studien

Die nachfolgend aufgeführten AMD-Fall-Kontroll-Studien wurden durch die örtlichen Ethik-Komitees der Universitäten Tübingen, München, Würzburg und Bonn positiv beschieden. Sie folgten den Grundsätzen der Deklaration des Weltärztebundes zu Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen (Helsinki, Juni 1964). Alle Testpersonen, Patienten und Kontrollindividuen, wurden über die Natur der Studien umfassend aufgeklärt und gaben ihre schriftliche informierte Zustimmung vor der Blutentnahme.

#### 2.1.1 Unterfränkische AMD-Fall-Kontroll-Studie

Voraussetzung für eine Durchführung der Arbeiten war der Zugang zu einem umfassenden Patientenkollektiv. Dies stand mit der sogenannten unterfränkischen AMD-Fall-Kontroll-Studie zur Verfügung. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. von Strachwitz wurden seit 2001 Patienten und Kontrollen an der Universitätsaugenklinik Würzburg rekrutiert. Die Klassifizierung der AMD-Patienten erfolgte nach dem Internationalen Klassifikations- und Graduierungssystem für altersabhängige Makuladegeneration (Bird *et al.* 1995).

Personen mit Frühformen der AMD wurden in eine Gruppe mit geringem Risiko (weiche, deutliche Drusen im Bereich von 63 – 125  $\mu\text{m}$ ; Pigmentveränderungen ohne weiche Drusen) und in eine Gruppe mit hohem Risiko (weiche undeutliche Drusen oder retikuläre Drusen mit einer Größe über 125 $\mu\text{m}$ ; weiche, deutliche Drusen im Bereich von 63 bis 125  $\mu\text{m}$  mit Pigmentveränderungen; retikuläre Drusen mit Pigmentveränderungen) unterteilt.

Personen mit frühen Veränderungen, wie z.B. harten Drusen und/oder mäßigen Pigmentveränderungen in beiden Augen, wurden ausgeschlossen, weil diese Veränderungen normale Altersprozesse darstellen können und nicht unbedingt mit der Entwicklung einer AMD zusammenhängen. Des Weiteren wurden Patienten mit bilateraler choroidaler Neovaskularisation oder makulären Narben nicht in die Studie aufgenommen, weil sich der zugrundeliegende Phänotyp nicht eindeutig bestimmen ließ.

Insgesamt umfasst die Studie 1.166 AMD-Patienten (Durchschnittsalter:  $78,0 \pm 6,8$  Jahre; 65,7 % weiblich) und 796 Kontrollpersonen (Durchschnittsalter:  $78,4 \pm 5,1$  Jahre; 60,7 % weiblich). In den AMD-Kategorien fanden sich 165 Personen mit CNV und GA, 631 mit CNV, 218 mit GA, sowie 152 mit ARM. Die ARM-Gruppe ließ sich unterteilen in 68 mit

niedrigem und 83 mit hohem AMD-Risiko. Falls sich die Kategorie zwischen den Augen unterschied, richtete sich diese jeweils nach der schwerwiegenderen Form.

### **2.1.2 Deutsche Replikationsstudie**

Die verwendete deutsche Replikationsstudie bestand aus 373 unverwandten AMD-Patienten (Durchschnittsalter:  $75,0 \pm 7,5$ ; 64,9 % weiblich) und 335 unverwandten Kontrollpersonen (Durchschnittsalter:  $68,3 \pm 8,1$  Jahre; 55,5 % weiblich). Alle Studienteilnehmer wurden im Rahmen eines Gemeinschaftsprojekts mit der Lynkeus Biotech GmbH (Würzburg) durch die Universitäts-Augenkliniken Tübingen und München rekrutiert.

### **2.1.3 Nowgorodskaya-Oblast-Isolat (Russland)**

Die Nowgorodskaya-Oblast-Kohorte bestand aus 155 AMD-Patienten (Durchschnittsalter:  $72,6 \pm 7,6$  Jahre; 72,3 % weiblich) und 151 altersangepassten Kontrollen (Durchschnittsalter:  $71,1 \pm 7,3$  Jahre; 27,7 % weiblich), die durch Augenkliniken innerhalb des Nowgorodskaya-Oblasts (Russland) rekrutiert wurden. Von den 155 AMD-Patienten besaßen 63 AMD-Spätformen und 92 ARM. Die ARM-Gruppe ließ sich zudem weiter in 17 Patienten mit niedrigem und 75 mit hohem AMD-Risiko unterteilen.

### **2.1.4 Bonner AMD-Studie**

Die Bonner AMD-Studie bestand aus 112 AMD-Patienten (Durchschnittsalter:  $75,6 \pm 6,6$  Jahre; 63,4 % weiblich) und 67 Kontrollpersonen (Durchschnittsalter:  $70,1 \pm 6,0$  Jahre; 44,8 % weiblich), die von der Universitätsaugenklinik Bonn rekrutiert wurden. Unter den Patienten befanden sich 25 mit CNV, 78 mit GA und 9 mit ARM.

## **2.2 Sequenzanalysen und SNP-Genotypisierungen**

### **2.2.1 DNA-Sequenzierung mittels Fluoreszenzkapillarsequenzierung**

Die Kapillarsequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977). Je nach PCR-(*polymerase chain reaction*)-Produktmenge (Abschätzen auf Agarosegel) werden 0,5 – 3  $\mu$ l des PCR-Ansatzes mit 0,1  $\mu$ l Exonuklease I (20 U/ $\mu$ l) und 0,25  $\mu$ l Phosphatase in einem Gesamtvolumen von 5  $\mu$ l für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Exonuklease I verdaut hierbei einzelsträngige DNA mit einem freiem 3'-Ende, wie z.B. restliche Primer, wohingegen die Phosphatase freie 5'-Phosphatgruppen von übrig gebliebenen Desoxynukleotiden abspaltet und somit für die Sequenzierreaktion unbrauchbar macht. Nach der Deaktivierung der Enzyme durch einen 15-minütigen

Hitzeschritt bei 80 °C gibt man 2 µl 5x Sequenzierpuffer, 0,4 µM Primer und 0,5 µl „BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix“ (enthält Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide, DNA-Polymerase mit Aktivitätsmaximum bei 60 °C, Applied Biosystems, UK) in einem Endvolumen von 10 µl dazu. Die *cycle sequencing*-Reaktion läuft nach einem 5-minütigen Aufkochen bei 94 °C in 25 Zyklen ab, die sich wie folgt gliedern: 94 °C für 30 sec, 52 °C für 30 sec und 60 °C für 3 min. Abschließend folgen 5 min bei 60 °C. Der Ansatz wird mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 2,5x Vol Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzer Trocknungszeit in 10 µl „Hi-Di™ Formamid“ aufgenommen. Die Analyse erfolgt in einem automatischen Kapillarsequenzierer („3130xl Genetic Analyzer“, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die resultierenden Sequenzdaten werden anschließend mit dem Programm „Chromas“ (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) ausgewertet.

### 2.2.2 SNP-Genotypisierung mittels MALDI-TOF

Für eine schnelle und kostengünstige Genotypisierung von mehreren SNPs in einem größeren Kollektiv von Testpersonen bietet sich die auf MALDITOF-MS-*(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)*-basierende Methode einer Primerextensionsreaktion an. Hier werden Allel-spezifische Primerextensionsprodukte aufgrund ihres unterschiedlichen Gewichts massenspektrometrisch unterschieden. Durch den Einsatz von *multiplex* PCRs lassen sich hierbei bis zu 40 SNPs gleichzeitig genotypisieren („MassARRAY® System“ und „iPLEX™ Assay“, Sequenom, San Diego, CA, USA). Alle MALDITOF-Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Humangenetik des Helmholtz-Zentrums München (Leiter Prof. Dr. Thomas Meitinger) durchgeführt.

### 2.2.3 Allelische Diskriminierungs-Assays

Alternativ wurde für die Hochdurchsatz-Genotypisierung einzelner SNPs auf allelische Diskriminierungs-Assays zurückgegriffen (TaqMan® SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems). Die Untersuchung basiert auf Allel-spezifischen Oligonukleotidsonden (TaqMan®-Sonden), die jeweils unterschiedliche Fluorophore sowie einen Fluoreszenzlöcher (*quencher*) tragen. Diese binden Allel-spezifisch PCR-Produkte, welche den entsprechenden SNP enthalten. Durch Abspaltung des Fluorophors während der PCR kommt es zur räumlichen Trennung des *quenchers* und des Fluorophors, welcher nach entsprechender Anregung als Fluoreszenz detektiert werden kann (Taq Man 7900HT Fast

Real-time PCR System, Applied Biosystems). Für homozygote Allelträger ergeben sich dadurch die jeweiligen reinen Fluoreszenzsignale der einzelnen Fluorophore, für heterozygote Allelträger eine Mischfluoreszenz. Die Fluoreszenzsignale von mehreren Personen werden nach der Analyse in so genannten *cluster plots* graphisch dargestellt und die entsprechenden Wolken (*cluster*) den einzelnen Genotypen zugeordnet (SDS software Version 2.0, Applied Biosystems).

## 2.3 Statistische Analysen

### 2.3.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg *equilibrium*, HWE) beschreibt den Zustand einer idealen Population, in der die Häufigkeiten der Allele und die Häufigkeiten der Genotypen konstant bleiben. Die Gleichungen des HWE lauten:

$$\begin{aligned} p^2 + 2pq + q^2 &= 1 \\ p + q &= 1 \end{aligned}$$

$p$ : relative Häufigkeit des Auftretens des Allels  $A$

$q$ : relative Häufigkeit des (zu  $A$  komplementären) Allels  $a$

Um Hinweise auf mögliche Genotypisierungsfehler oder eine Stichproben-Stratifizierung zu erhalten, wird jede SNP-Genotypisierung auf signifikante Abweichungen vom HWE untersucht. Standardmäßig werden  $P$ -Werte unter 0,001 als signifikant erachtet und entsprechende SNPs von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Da es in Patientengruppen durch die angewendete Patienten-Selektion zu Stichproben-Stratifizierungen kommen kann, wird standardmäßig nur die Kontroll-Population (weitgehend unselektiert) auf Abweichungen vom HWE untersucht.

### 2.3.2 SNP Analyse

Die statistischen Tests der einzelnen SNPs werden ohne Modell-Annahme (allelischer und genotypischer Test), aber auch mit Modell-Annahmen (heterozygoter, homozygoter, dominanter, rezessiver und additiver Test) durchgeführt (Tab. 1).

Die Berechnung der einzelnen Tests erfolgt mittels Chi-Quadrattest ( $\chi^2$ -Test) oder Fishers Exakttest. Alternativ zum allelischen Test wird bevorzugt der Trend-Test nach Cochran-Armitage angewendet, der im Vergleich nicht Allele, sondern Individuen als Testeinheit verwendet. Dazugehörige Quotenverhältnisse (*odds ratios*, OR; Schätzer des relativen Risikos einer Fall-Kontroll-Studie) werden jeweils mit 95 %igen Konfidenzintervallen



angegeben, die mittels Wald-Test ermittelt werden. Die verwendeten Programme zur statistischen SNP-Analyse sind „Haploview“, „PLINK“ oder „R“ in Kombination mit „Bioconductor“-Bibliotheken (siehe 2.3.5).

**Tabelle 1:** A = häufigeres Allel; a = marginales Allel

Statistischer Test	Berechnung
Allelisch	a gegen A
Genotyp	a/a gegen A/a gegen A/A
Heterozygot	A/a gegen A/A
Homozygot	a/a gegen A/A
Dominant	(A/a, a/a) gegen A/A
Rezessiv	a/a gegen (A/A, A/a)
Additiv	a/a gegen A/A sowie 2 x (A/a) gegen A/A

### 2.3.3 LD-Berechnung

Für die Beschreibung des LDs, d.h. der nicht-zufälligen Mischung der Allele in den Gameten an verschiedenen Loci, werden zwei Maße verwendet, Lewontin's  $D'$  und der Kopplungsungleichgewichtskoeffizient  $r^2$ , die beide den paarweisen Zusammenhang zwischen zwei Markern unter der Annahme von HWE beschreiben.  $D'$  ist gleich 1 („komplettes LD“) wenn die Häufigkeit eines Haplotyps zweier Marker von der zufälligen Verteilung ihrer Markerallele gegeben ihrer marginalen Allelfrequenz maximal abweicht oder maximal drei der vier möglichen Allelkombinationen beobachtet werden. Diese Situation liegt vor wenn z.B. zwei SNPs demselben Abstammungszweig entsprangen und nicht durch Rekombination getrennt wurden.

$r^2$  ist gleich 1 („perfektes LD“), wenn zwei SNPs perfekt korreliert sind. Werte von  $r^2$  sind kleiner als 1, wenn SNPs aus verschiedenen Abstammungszweigen entsprangen oder wenn eine ursprünglich starke Kopplung durch Rekombination getrennt wurde.

Liegt zwischen SNPs eine starke Kopplung vor, kann durch Genotypisieren von nur einem SNP eine Aussage über die weiteren gekoppelten SNPs gemacht werden. Der „Tagger“-Algorithmus, implementiert in „Haploview“ (siehe 2.3.5.), nutzt genau diesen Zusammenhang, um einen minimalen Satz an SNPs zusammenzustellen, der ausreicht um

die häufige, genetische Vielfalt einer Region nahezu vollständig zu erfassen. Hierzu werden SNPs ab einer definierten Frequenz betrachtet und alle mit Ausnahme von stark gekoppelten, redundanten SNPs ( $r^2 \geq 0,8$ ) zur Genotypisierung ausgewählt.

### 2.3.4 Haplotypanalyse

Besteht zwischen mehreren SNPs eine hinreichend starke Kopplung spricht man von einem sogenannten Haplotypblock. Ein Haplotypblock beinhaltet aufgrund der nicht-zufälligen Verteilung der Allele eine reduzierte Anzahl der theoretisch möglichen Allelkombinationen. Ein solcher Haplotypblock kann nach der „*haplotype diversity*“-Methode von Patil *et al.* (2001), der Konfidenzintervallmethode von Gabriel *et al.* (2002) oder der „*solid spine*“-Methode, implementiert in den Programmen „HapBlock“ bzw. „Haploview“, definiert werden. Im Falle des Programms „HapBlock“ wird ein Haplotypblock als solcher definiert, wenn die häufigen Haplotypen ( $\geq 5\%$ ) eines Haplotypblocks mindestens 80 % aller enthaltenen Haplotypen ausmachen. Für die Konfidenzintervall- und die „*solid spine*“-Methode wurde jeweils die Standard-Einstellung des Programms „Haploview“ verwendet. Von einem definierten Haplotypblock können die Frequenzen der beinhalteten Haplotypen mittels *expectation-maximization*-Algorithmen, implementiert in den Programmen „HapBlock“, „Haploview“, „FAMHAP“ oder „UNPHASED“, geschätzt werden. Im Falle des Programms „FAMHAP“ können darüber hinaus die einzelnen Haplotypphasen eines Individuums annähernd genau rekonstruiert werden, wobei für ein Individuum jeweils der Haplotyp mit dem höchsten Wahrscheinlichkeitsgewicht (*likelihood weight*) angenommen wird, das für den wahrscheinlichsten Fall einen Wert von 1 und für den unwahrscheinlichsten Fall einen Wert von 0 annimmt.

Außerdem können für geschätzte Haplotypen mittels der Programme „HapBlock“ bzw. „Haploview“ Kombinationen von SNPs ermittelt werden, deren Allele einen Haplotyp eindeutig identifizieren und ihn von anderen Haplotypen unterscheiden lassen. Die Gesamtheit dieser sogenannten *tag*-SNPs (*tag*, Kenn-, Markenzeichen) machen in der Regel nur einen Bruchteil der tatsächlichen SNP-Anzahl eines Haplotypblocks aus und erlaubt dennoch eine ausreichend genaue Aussage über die entsprechenden Haplotypen. Um die häufige, genetische Variation einer Region zu erfassen, können die *tag*-SNPs mit der „*haplotype diversity*“-Methode nach Johnson *et al.* (2001) implementiert in „HapBlock“ bestimmt werden, wobei die ausgewählten *tag*-SNPs per Definition in der Lage sind, mindestens 80 % der häufigen Haplotypen eindeutig zu beschreiben.

### 2.3.5 Verwendete statistische Software-Programme

---

Programm	Internetadresse
Bioconductor	<a href="http://www.bioconductor.org/">http://www.bioconductor.org/</a>
FAMHAP	<a href="http://famhap.meb.uni-bonn.de/">http://famhap.meb.uni-bonn.de/</a>
HapBlock	<a href="http://www.cmb.usc.edu/~msms/HapBlock/">http://www.cmb.usc.edu/~msms/HapBlock/</a>
Haploview	<a href="http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php">http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php</a>
PLINK	<a href="http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/">http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/</a>
R	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>
UNPHASED	<a href="http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/">http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/</a>

---

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Das Kandidatengen *APOE* (Fritsche *et al.* 2009)

Das Apolipoprotein E wird funktionell hauptsächlich mit dem Lipidstoffwechsel im Plasma und im zentralen Nervensystem in Zusammenhang gebracht. Daneben scheint es aber auch weitere Funktionen, z.B. bei der Immunregulation oder der Signalweiterleitung, zu erfüllen (Mahley and Rall 2000; Hui 2004). Gerade die letzteren Funktionen lassen sich überzeugend mit aktuellen Konzepten der AMD-Pathogenese in Einklang bringen, weshalb eine Assoziation von *APOE*-Varianten mit der AMD durchaus sinnvoll und *APOE* somit als funktionelles Kandidatengen sehr vielversprechend erscheint. Erste Studien konnten bereits 1998 eine Assoziation zwischen AMD und *APOE*-Genvarianten aufzeigen (Klaver *et al.* 1998; Souied *et al.* 1998). Aufgrund von inzwischen 12 veröffentlichten Replikationsstudien ist das *APOE* eines der am beständigsten replizierten AMD-Suszeptibilitätsgene (Schmidt *et al.* 2000; Simonelli *et al.* 2001; Schmidt *et al.* 2002; Schultz *et al.* 2003; Baird *et al.* 2004; Gotoh *et al.* 2004; Zareparsari *et al.* 2004; Schmidt *et al.* 2005; Baird *et al.* 2006; Bojanowski *et al.* 2006; DeAngelis *et al.* 2007; Ng *et al.* 2008). All diese *APOE*-Studien basieren auf der Untersuchung von zwei häufigen SNPs, die sich 139 Basenpaare voneinander entfernt im vierten Exon des *APOE*-Gens befinden (rs429358:T>C und rs7412:C>T) und beide einen Aminosäureaustausch nach sich ziehen (C112R bzw. R158C). Da zwischen beiden SNPs ein starkes LD vorliegt, werden in der allgemeinen Bevölkerung nur drei der vier theoretisch möglichen Haplotypen beobachtet. Diese traditionell als Epsilon-Allele  $\epsilon 2$  [rs429358:T - rs7412:T],  $\epsilon 3$  [rs429358:T - rs7412:C], und  $\epsilon 4$  [rs429358:C - rs7412:C] bezeichneten Haplotypen resultieren in funktionell unterschiedlichen Proteinisoformen (Mahley and Rall 2000), wobei  $\epsilon 3$  mit einer Frequenz von ungefähr 70–80 % den Referenzhaplotyp repräsentiert.

In der Mehrzahl der bisherigen *APOE*/AMD-Studien wurde eine signifikant höhere Frequenz des  $\epsilon 4$ -Haplotyps in Kontrollpersonen im Vergleich zu AMD-Patienten festgestellt (13,2 % versus 9,5 %). Hierbei reduzierte der entsprechend protektive Effekt im dominanten Modell das AMD-Risiko schätzungsweise um 40–60 % (Thakkinstian *et al.* 2006). Beim  $\epsilon 2$ -Haplotyp deutet sich hingegen ein AMD-verursachender, wenn auch schwächerer Effekt an, der in den meisten Studien allerdings statistisch lediglich grenzwertig signifikant ist.

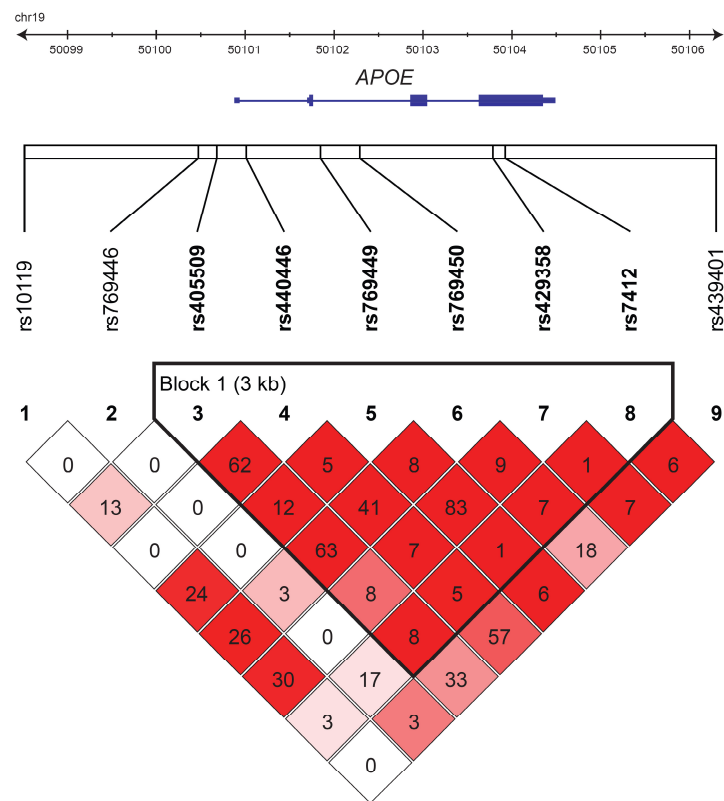
Daneben konnte in AMD-unabhängigen Promotor- und Expressionsanalysen des *APOE*-Gens gezeigt werden, dass neben den beiden kodierenden SNPs auch funktionelle, regulatorische SNPs existieren, die eine modifizierende Rolle bei der Expression der *APOE*-Isoformen haben könnten (Artiga *et al.* 1998; Bullido *et al.* 1998; Campillos *et al.* 2003; Ramos *et al.* 2005; Belbin *et al.* 2007; Yu *et al.* 2007). Bei Morbus Alzheimer wurden analog zu den kodierenden SNPs Assoziationen mit den Promotor-SNPs festgestellt (Artiga *et al.* 1998; Lambert *et al.* 1998; Lambert *et al.* 1998; Town *et al.* 1998). Daher wurde für das AMD Fall-Kontroll-Kollektiv eine umfassende Untersuchung des gesamten *APOE*-Locus unternommen. Damit sollte untersucht werden, ob Promotor-SNPs ebenfalls mit der AMD assoziiert sind und wenn ja, inwieweit eine solche Assoziation unabhängig von den bekannten Beziehungen der  $\epsilon$ -Haplotypen ist.

Zur Erweiterung der bisherigen Assoziationsstudien über die beiden  $\epsilon$ -Haplotyp-definierenden SNPs wurden in dieser Studie sieben weitere häufige SNPs der *APOE*-Region einbezogen, die zum Teil als cis-regulatorische Promotor-SNPs bekannt sind (rs449647:A>T, rs769446:T>C, rs405509:G>T, und rs440446:G>C) (Artiga *et al.* 1998; Bullido *et al.* 1998; Campillos *et al.* 2003; Ramos *et al.* 2005).

Zunächst konnte durch Analyse der  $\epsilon$ -Haplotypen sowohl der protektive Effekt des  $\epsilon$ 4-Haplotyps als auch der kausale Effekt des  $\epsilon$ 2-Haplotyps signifikant repliziert werden. Darüber hinaus wurde bei der Einzel-SNP-Analyse der neun SNPs ein signifikanter, AMD-protektiver Effekt des intronischen SNPs rs769450 im rezessiven Modell erfasst.

Mittels anschließender LD-Analyse konnte festgestellt werden, dass sich fast das komplette *APOE*-Gen einschließlich Promotorregion in einem 3,2 kb großen LD-Block befindet. Somit können die klassischen  $\epsilon$ -Haplotypen um vier SNPs erweitert werden (Abb. 2). Die Schätzung der entsprechenden Haplotypen ergab, dass die fünf häufigsten Haplotypen zusammen über 98 % aller Haplotypen in der Bevölkerung ausmachen. Die allgemeine, genetische Heterogenität des *APOE*-Gens ist somit größer als bisher anhand der drei bekannten  $\epsilon$ -Haplotypen bzw. Proteinisoformen angenommen wurde.

Unsere Assoziationsstudie ergab ferner, dass nur bestimmte Kombinationen der erweiterten  $\epsilon$ -Haplotypen mit AMD assoziiert sind. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass regulatorische Effekte eine Rolle bei der AMD spielen, bzw. dass diese die Expression der Proteinisoformen modifizieren könnten. Diese Vermutung konnte durch die nicht-zufällige



**Abbildung 2:** LD-Karte des *APOE*-Gens. Die genomische Position [in kb] und die schematische Exon-Intron-Struktur sind über der LD-Karte dargestellt. Die relativen Positionen der SNPs werden durch vertikale Linien repräsentiert. Paarweise Werte von  $r^2$  sind in den Rauten, deren Farbschattierung D' mit zunehmender Stärke von weiß nach rot repräsentiert, angegeben.

Verteilung mancher cis-regulatorischer Promotor-SNPs auf die drei Proteinisoformen bekräftigt werden.

Von den bekannten regulatorischen SNPs erschien der Promotor-SNP rs405509:G>T besonders interessant, da dieser in bisherigen Studien den größten Einfluss auf die *APOE*-Expression auszuüben scheint. Für das G-Allel von rs405509 konnte eine um bis zu 169 % erhöhte Expression gegenüber dem alternativen T-Allel gezeigt werden (Artiga *et al.* 1998; Campillos *et al.* 2003; Ramos *et al.* 2005). In der Haplotypanalyse fielen zwei signifikant assoziierte Haplotypkombinationen auf, die homozygot für das G-Allel bzw. das T-Allel von rs405509 waren und somit eine starke bzw. niedrige *APOE*-Expression aufweisen sollten. Erstaunlicherweise waren beide mit einem erniedrigten AMD-Risiko assoziiert. Folglich kann die *APOE*-Expressionsstärke nicht die alleinige Ursache der beobachteten Assoziation sein. Vielmehr könnte hier ein Zusammenhang mit den gekoppelten  $\epsilon$ -Haplotypen vorliegen. Beispielsweise sollte dann die Haplotypkombination G-G-G-A- $\epsilon$ 3 /

G-G-GA- $\epsilon$ 3, die homozygot für das rs405509:G-Allel (LD-Block-Position 1, Abb. 2) ist, eine erhöhte APOE3-Expression zeigen.

Eine zweite signifikante Haplotypkombination repräsentierte dagegen eine  $\epsilon$ 4- /  $\epsilon$ 3-Kombination, und zwar die einzige in der der schwach exprimierte Haplotyp T-G-A-G- $\epsilon$ 4 auf einen schwach exprimierten  $\epsilon$ 3-Haplotyp trifft. Daraus lässt sich folgern, dass der Effekt des Haplotyps T-G-A-G- $\epsilon$ 4 in einer heterozygoten Situation nur zur Ausprägung gelangt, wenn dieser nicht durch einen anderen Partnerhaplotyp dominiert wird. Im Gegensatz dazu scheint der Effekt des einzigen  $\epsilon$ 2-Haplotyps, der immer ein rs405509:G-Allel trägt, nicht von einem Partnerhaplotyp abzuhängen. Nichtsdestotrotz war die Assoziation des  $\epsilon$ 2-Haplotyps deutlich geringer als die des  $\epsilon$ 4-Haplotyps.

Die erfolgreiche Replikation der Assoziation der Haplotypen  $\epsilon$ 2 und  $\epsilon$ 4 mit der AMD zeigte, dass die verwendete Fall-Kontroll-Studie ausreichend Aussagekraft besitzt, um selbst relativ geringe Effekte signifikant schätzen zu können. Darüber hinaus konnten durch den Einschluss von weiteren SNPs des *APOE*-Genorts bis dato unbekannte SNP- und Haplotypassoziationen mit der AMD detektiert werden.

Ausgehend auf den publizierten Arbeiten zum cis-regulatorischen Einfluss des Promotor-SNPs rs405509:G>T lässt sich aufgrund dieser Arbeiten ein Erklärungsansatz für die beobachteten Assoziationen der verschiedenen Haplotypkombinationen formulieren.

Die rezessive, protektive Assoziation des Haplotyps G-G-G-A- $\epsilon$ 3 könnte mit einer erhöhten APOE3-Expression einhergehen, da diese Haplotypkombination das rs405509:G homozygot trägt. Interessanterweise wurden bei Männern, die einen vergleichbaren *APOE*-Haplotyp besaßen, nach einer Spezial-Diät (reich an gesättigten Fettsäuren) ein erniedrigter LDL-Cholesterinspiegel und eine vermindertes Risiko von Plasma-LDL-Oxidation festgestellt (Shimano *et al.* 1992). Ähnlich könnte eine vermeintlich gesteigerte APOE3-Expression im RPE, einem Gewebe, das anfällig für oxidativen Stress ist, das AMD-Risiko vermindern (Liang and Godley 2003; Zarbin 2004).

Eine Hypothese zur Risikominderung der APOE4-Proteinisoform beruht auf der Tatsache einer zusätzlichen negativen Ladung des Arg158-Restes. So wird vermutet, dass APOE4 aufgrund dieser Ladung die Bruchse Membran leichtert passieren und somit einen gesteigerten Lipidabtransport gewährleisten kann (Souied *et al.* 1998). Bemerkenswerterweise wurde in RPE-Zellen nach APOE-Expression eine Herunterregulierung von Chemokinrezeptoren und VEGFA (*vascular endothelial growth*

*factor A*) festgestellt, die bei der APOE4-Isoform besonders ausgeprägt war (Bojanowski *et al.* 2006).

Die Besonderheit der APOE2-Isoform hingegen könnte durch deren zusätzlichen Cys112-Rest und das damit verbundene erhöhte Dimerisierungspotential durch Disulfidbrückenbindungen erklärbar sein. So wurde unter anderem festgestellt, dass sich das Dimerisierungspotential zwischen Zelltypen unterscheidet. In Leberzellen scheint es nicht, in Makrophagen aber besonders ausgeprägt zu sein. Letzteres scheint zudem in eine gehemmte APOE-Sekretion zu münden (Fan *et al.* 2007). Da APOE unter anderem den Ausstrom von Cholesterin und Phospholipiden aus Makrophagen vermittelt, könnte das beobachtete erhöhte AMD-Risiko auf einem reduzierten Lipidabtransport beruhen (Lin *et al.* 1999).

Die Beobachtung, dass nur bestimmte Haplotypkombinationen mit der AMD assoziiert sind, lässt vermuten, dass bestimmte APOE-Isoformen differentiell exprimiert werden (intragenische Epistase) und je nach Kombination einen unterschiedlichen Beitrag zum AMD-Risiko besitzen. Die Schwierigkeiten von bisherigen Studien, die Assoziationen zu replizieren, könnten mit diesem epistatische Phänomen zusammenhängen. Die Assoziation des  $\epsilon$ 2-Haplotyps scheint jedoch nicht von diesem Phänomen abzuhängen, war aber deutlich schwächer als die des  $\epsilon$ 4-Haplotyps, weshalb sie vermutlich ebenfalls selten signifikant repliziert werden konnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das AMD-Risiko der  $\epsilon$ -Haplotypen neben Isoform-spezifischen Unterschieden auch von weiteren cis-regulatorischen SNPs beeinflusst wird. Gezielte funktionelle Studien sind notwendig, um diese Befunde weiter zu untermauern. Unabhängig davon deutet sich durch die statistischen Untersuchungen an, dass eine alleinige Genotypisierung der kodierenden *APOE*-SNPs für eine AMD-Risiko-Abschätzung unzureichend und daher die Miteinbeziehung von cis-regulatorischer Varianten erforderlich ist.



### 3.2 Das Kandidatengen *HMCN1* (Fisher *et al.* 2007)

Eine Kopplungsanalyse einer großen Familie mit AMD-ähnlichem Phänotyp rückte den Chromosomenabschnitt 1q25–31 in den Fokus von AMD-Assoziationsstudien (Klein *et al.* 1998). Dieser Bereich konnte nachfolgend auf einen 14,9 Mb Abschnitt mit 20 Genen eingegrenzt werden (Schultz *et al.* 2003). Mittels Untersuchung der Kosegregation von Polymorphismen dieser Gene mit der AMD wurde im Anschluss versucht eine kausale Variante zu bestimmen. Interessanterweise wurden hierbei auch das *CFH*-Gen und fast alle seiner mittlerweile bekannten Risikovarianten analysiert. Jedoch wurde hierfür keine exklusive Segregation mit der AMD festgestellt (Schultz *et al.* 2003). Stattdessen kam für diese Familie die Q5346R-Variante im Exon 104 des *HMCN1*-Gens, das für ein großes extrazelluläres Protein der Immunglobulin-Superfamilie kodiert, in Betracht, welche ausschließlich mit dem Risikohaplotyp der untersuchten Region segregierte. Diese Variante wurde in 10 von 16 AMD-Patienten jedoch nicht in den gesunden Familienmitgliedern detektiert, weshalb die Q5346R-Variante als AMD-verursachend angesehen wurde. Eine mögliche indirekte Assoziation mit anderen gekoppelten Varianten wurde allerdings nicht ausgeschlossen (Schultz *et al.* 2003). Außerdem konnte bis heute kein funktioneller Nachweis der Kausalität der Q5346R-Variante erbracht werden.

Dennoch wurde die Q5346R-Variante in einer Vielzahl von weiteren AMD-Studien untersucht, wobei sich herausstellte, dass diese zwar in sporadischen AMD-Patienten zu finden, jedoch aufgrund ihrer geringen Häufigkeit nicht signifikant mit der AMD assoziiert war. Mitunter besaßen diese Studien aufgrund ihrer kleinen Stichprobengrößen, besonders bei den Kontrollgruppen, wenig Aussagekraft (Schultz *et al.* 2003; Abecasis *et al.* 2004; Hayashi *et al.* 2004; McKay *et al.* 2004; Stone *et al.* 2004; Edwards *et al.* 2005; Schultz *et al.* 2005; Seitsonen *et al.* 2006).

Zur weiteren Abklärung haben wir daher eine zweistufige Haplotyp-basierte Assoziationsstudie des *HMCN1*-Genorts durchgeführt, welche dessen allgemeine, genetische Heterogenität und deren Rolle bei der AMD erfassen sollte. Da die verwendete Stichprobe mit insgesamt 1.662 AMD-Patienten und 1.162 Kontrollpersonen ausreichend Aussagekraft besaß, sollte die Frage nach einer Assoziation zwischen häufigen *HMCN1*-Varianten und der AMD beantwortet werden können.

Zum Aufspüren von häufigen *HMCN1*-Varianten wurden zunächst alle 107 Exone des *HMCN1* inklusive der 5'- und 3'-untranslatierten Region, sowie der intronischen Bereiche

von acht zufällig ausgewählten Kontrollpersonen resequenziert. Dabei wurden insgesamt 65 Varianten gefunden, von denen 31 aufgrund ihrer Kopplung (Vermeidung von Redundanz), gleichmäßigen Verteilung oder vermeintlich funktionellen Rolle (nicht-synonyme, kodierende Variante) ausgewählt und in weiteren 24 Personen bestätigt wurden. Mittels anschließender LD-Analyse konnten 12 der 31 SNPs als „tagging“-SNPs definiert werden, welche alle häufigen Haplotypen (über 5 %) eindeutig identifizieren konnten. Diese 12 und zwei weitere SNPs mit funktioneller Relevanz (rs10798035:G>A [E2894Q] und rs10911825:A>G [Q4438R]) wurden zur Beurteilung ihrer Assoziation in der initialen Würzburger Fall-Kontroll-Studie bestehend aus 794 AMD-Patienten und 612 Kontrollpersonen genotypisiert. Sechs der 14 untersuchten SNPs zeigten eine marginal signifikante Assoziation mit der AMD ( $0,020 \leq P \leq 0,061$ ), welche nach Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen nicht mehr zu beobachten war ( $P > 0,1$ ). Eine Rolle dieser häufigen SNPs bei der AMD wurde daher als unwahrscheinlich erachtet.

Dennoch wurde in der nachfolgenden Haplotypanalyse im 3'-Genbereich von *HMCN1* ein Haplotypblock bestehend aus drei SNPs (rs6425021:G>A, rs11582026:A>G, rs16825040:C>G) gefunden, der einen signifikant mit der AMD assoziierten Haplotyp enthielt (G-A-G;  $P = 0,0006$ ).

Zur Validierung dieser Assoziation wurden die 12 „tagging“-SNPs in einer zweiten, unabhängigen Fall-Kontroll-Studie bestehend aus 868 AMD-Patienten und 548 Kontrollen aus Tübingen, München und Würzburg genotypisiert. Der SNP rs6425021, der Teil des assoziierten Haplotypblocks ist, ließ sich allerdings trotz wiederholtem Versuch nicht genotypisieren. Von den verbleibenden 11 SNPs zeigte kein einziger eine marginale Assoziation ( $P \geq 0,17$ ). Zwar umfasste der replizierte Haplotyp wegen des Ausfalls von rs6425021 nur noch zwei SNPs (rs11582026:A-rs16825040:G), jedoch reichten diese aus um einen gegenteiligen Trend der Haplotypfrequenzen in beiden Stichproben zu erkennen. So waren die Haplotypfrequenz der AMD-Patienten in der Replikationsstudie kleiner als die der Kontrollpersonen (14,6 % gegenüber 16,4 %;  $P = 0,23$ ), wohingegen der Haplotyp in der initialen Studie häufiger in AMD-Patienten zu finden war (17,4 % gegenüber 13,1 %;  $P = 0,0016$ ). Da dementsprechend kein Assoziationssignal von häufigen SNPs oder Haplotypen des *HMCN1*-Gens bestätigt werden konnte, wurde die Hypothese der Assoziation zwischen häufigen *HMCN1*-Varianten und der AMD verworfen.

Alternativ wurde deshalb die Analyse um seltene Varianten erweitert, die eventuell die Ursache der initial gefundenen Haplotypassoziation sein könnten. Hierzu wurden alle 107

Exone in 24 Personen, die den Risikohaplotyp rs6425021:G-rs11582026:A-rs16825040:G besaßen (8 heterozygot; 16 homozygot), hinsichtlich seltener Varianten untersucht. Insgesamt wurden bei fünf AMD-Patienten *missense*-Mutationen gefunden, von denen fünf bisher nicht beschrieben waren. Anschließend wurden alle 17 bekannten, seltenen *missense*-Mutationen, darunter 12 bereits beschriebene Varianten (Stone *et al.* 2004), in der Gesamtstudie bestehend aus 1.662 AMD-Fällen und 1.160 Kontrollpersonen genotypisiert. Von diesen konnten 16 erfolgreich genotypisiert werden. Drei *missense*-Mutationen (I4638V, D4744E, und D5088V) waren in der erweiterten Studie nicht zu finden. Die 13 Verbleibenden wiesen keine signifikanten Frequenzunterschiede zwischen AMD-Patienten und Kontrollpersonen auf. In der zusammengefassten Frequenz aller Varianten zeigte sich eine tendenziell höhere Frequenz in den AMD-Patienten als in den Kontrollen. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Q5346R-Variante, die bisher als krankheitsassoziiert angesehen wurde, wurde mit vergleichbarer, niedriger Frequenz in Kontrollen und in AMD-Patienten gefunden (6/1.160 [0,43 %] gegenüber 5/1.662 [0,30 %]). Interessanterweise wurden acht Patienten mit mehreren *missense*-Mutationen, jedoch keine einzige Kontrollperson mit mehr als einer gefunden.

Zur Klärung, ob es funktionelle Hinweise gibt, dass die detektierten *missense*-Mutationen trotz ihrer geringen Häufigkeit dennoch funktionell sein könnten, wurde der Grad der Aminosäure-Konservierung an den entsprechenden Proteindomänenpositionen bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass bis auf die beiden Varianten N1529S und I2419T keine hochkonservierten Aminosäurereste betroffen waren, was eher gegen eine funktionelle Rolle der wenig konservierten Aminosäurenreste spricht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die umfassende Analyse der 450 kb-großen, genomischen Region des *HMCN1*-Gens ergab, dass die untersuchten häufigen Varianten bzw. Haplotypen das AMD-Risiko nicht signifikant verändern. Dementsprechend konnte die „*common disease / common variant*“- (CD/CV)-Hypothese, die besagt, dass häufigen Krankheiten auch häufige genetische Varianten zugrunde liegen (Reich and Lander 2001), für das *HMCN1*-Gen weitgehend ausgeschlossen werden.

Deshalb wurde daher ein weiterer Ansatz gewählt, um festzustellen, ob die alternative Hypothese der „*common disease / rare variant*“ (CD/RV) für *HMCN1* zutreffen könnte. Diese besagt, dass eine einzelne, seltene Variante zwar kaum ein allgemeines Bevölkerungsrisiko bei einer häufigen Krankheit tragen kann, alle seltenen Varianten eines

Suszeptibilitätsgens zusammengekommen dazu jedoch sehr wohl im Stande sein könnten (Risch 1990; Smith and Lusi 2002). So wurden durch Resequenzierung aller 107 *HMCN1*-Exone in 24 Personen einige seltene *missense*-Mutationen gefunden, welche anschließend in 1.160 AMD-Patienten und 1.662 Kontrollpersonen genotypisiert wurden. Allerdings reichte die Aussagekraft der verwendeten AMD-Studie, welche weltweit zu den größten zählt, nicht aus, um statistische Signifikanzen zu erreichen. Die CD/RV-Hypothese für das *HMCN1*-Gen konnte daher weder akzeptiert noch verworfen werden. Jedoch zeigt unsere Studie, dass *HMCN1*, wenn überhaupt, dann eine eher untergeordnete Rolle bei der AMD spielt. Selbst die vermeintlich AMD-verursachende Q5346R-Variante wurde mit gleichen Häufigkeiten in AMD-Patienten und Kontrollpersonen gefunden, was nahelegt, dass es sich dabei eher um einen seltenen Polymorphismus, denn eine AMD-assoziierte Variante, handelt.

Tatsächlich könnten in der ursprünglichen AMD-Kopplungsstudie von Schultz *et al.* (2003) *CFH*-Varianten eine entscheidende Rolle gespielt haben. Zwar segregierten diese nicht exklusiv mit der AMD, jedoch entspricht dies den Erwartungen, da sie eine eher reduzierte Penetranz besitzen sollten. Denn obwohl deren Effekte für eine komplexe Erkrankung sehr groß sind, werden diese auch in über einem Drittel der altersangepassten, AMD-freien Kontrollpersonen gefunden (Rivera *et al.* 2005).

### 3.3 Replikationsstudien des *International AMD Genetics Consortiums*

Ein entscheidender Schritt bei der Aufklärung von genetischen Risikofaktoren ist die Bestätigung einer initial gefundenen Assoziation in weiteren unabhängigen Studien. Die Größe, die Qualität und damit die Aussagekraft der entsprechenden Studien sind hierbei von essentieller Bedeutung, vor allem, wenn der beobachtete Effekt klein und/oder sehr selten ist. Daneben hat die Vergleichbarkeit von Fall-Kontroll-Studien, insbesondere bei der Patientenrekrutierung einen sehr großen Einfluss. So können manche Assoziationen umwelt-, phänotyp- oder abstammungsspezifisch sein. Eine negative Replikation muss daher nicht zwangsläufig zur Verwerfung der Alternativhypothese, d.h. dem Ausschluss der initialen Assoziation führen. Erfüllt eine negative Replikationsstudie jedoch alle Qualitätskriterien und besitzt sie zudem eine deutlich höhere Aussagekraft (*power*) als die initiale Studie, kann mit ausreichender Gewissheit eine postulierte Alternativhypothese verworfen werden.

In einer Literaturübersicht von Haddad *et al.* (2006) wird die angesprochene Problematik besonders deutlich. Mit Ausnahme der Assoziation von *CFH*, *ARMS2*, *C2* und *APOE*, wurden über 15 weitere Kandidatengene bisher lediglich einmal analysiert oder gefundene Assoziationen nur einmal, jedoch mit ungenügender Aussagekraft, negativ repliziert. Daher sollten diese assoziierten Genorte dringend bis zu ihrer extensiven Untersuchung weiterhin als potentielle Kandidaten gehandelt werden.

Erfahrungen und Überlegungen in dieser Richtung haben international zu einer Praxis geführt, die fordert, dass neupostulierte Assoziationen mit mindestens einer unabhängigen Replikationsstudie abgesichert werden. Dessen ungeachtet, kann auch diese Praxis zu unzureichenden Ergebnissen führen, was anhand von zwei aktuellen AMD-Studien von Yang *et al.* (2008) und Ennis *et al.* (2008) deutlich wird, die ihre Ergebnisse jeweils in unabhängigen Kohorten replizieren konnten.

So fand die Studie von Yang *et al.* (2008) eine protektive Assoziation der *TLR3*-(*toll-like receptor 3*)-L412F-Variante spezifisch für die trockene Form der AMD. Die Ergebnisse wurden initial in 232 GA-Patienten und 359 Kontrollpersonen erhoben ( $P < 0,005$ ) und in zwei unabhängigen Replikationsstudien mit insgesamt 455 GA-Patienten und 555 Kontrollpersonen repliziert ( $P < 0,002$ ). Des Weiteren wurden auch funktionelle Daten der AMD-protektiven L412F-Variante erarbeitet.

Allerdings konnte diese Assoziation in einer neueren großen Replikationsstudie des *International AMD Genetics Consortiums* nicht repliziert werden ( $P = 0,59$ ). Dieses

Konsortium brachte acht AMD-Fall-Kontrollstudien zusammen, zu denen auch unsere Würzburger AMD-Studie gehörte. Das Gesamtkollektiv umfasst 1.080 GA-Patienten und 2.669 Kontrollpersonen (Allikmets *et al.* 2009). Eine negative Assoziation aufgrund fehlender Aussagekraft kann für eine solche Stichprobengröße ausgeschlossen werden. Bemerkenswerterweise wurde trotz vergleichbarer Allelfrequenzen der *TLR3*-L412F-Variante in allen Kontrollgruppen bei keiner der acht GA-Kohorten individuell eine signifikante Assoziation mit GA gefunden ( $P > 0,29$ ). Zudem überlappte eine der acht Replikationsstudien wesentlich mit der Kohorte von Yang *et al.* (2008). Es zeigten sich jedoch in den Daten widersprüchliche Allelfrequenzen innerhalb der GA-Patientengruppe. Obwohl die beobachtete Assoziation der *TLR3*-Variante mit GA nicht bestätigt werden konnte, könnte die Funktionalität der L412F-Variante tatsächlich Bestand haben. Diese hat jedoch nichts mit AMD bzw. GA zu tun (Allikmets *et al.* 2009).

Ein weiteres Beispiel zur angeführten Problematik falsch-positiver Replikationsstudien ist die Studie von Ennis *et al.* (2008). In einem Kandidatengenansatz wurde eine in 479 AMD-Patienten und 479 Kontrollpersonen eine Assoziation zwischen *SERPING1*-(*serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1*)-Varianten und AMD festgestellt ( $P = 0,0037$ ). Diese Assoziation wurde in einer unabhängigen Replikation mit 248 AMD-Patienten und 252 Kontrollpersonen bestätigt ( $P = 0,008$ ) (Ennis *et al.* 2008).

Diese Assoziation konnte in einer nachfolgenden Studie von Park *et al.* (2009), die 1.691 AMD-Patienten und 605 Kontrollpersonen umfasste, nicht bestätigt werden ( $P > 0,4$ ). Ähnlich verhielt es sich auch mit einer weiteren Replikation durch das *International AMD Genetics Consortiums* mit insgesamt 4.881 AMD-Patienten und 2.842 Kontrollpersonen. Auch hier konnte keine signifikante Assoziation beobachtet werden ( $P = 0,99$ ) (Allikmets *et al.* 2009). Somit ist die Alternativhypothese von Ennis *et al.* (2008), nämlich eine Assoziation von *SERPING1*-Varianten mit der AMD, ebenfalls verworfen.

Anhand der beiden oben angeführten Beispiele, die mit großer Wahrscheinlichkeit einem Fehler-Typ II (falsch-positive Assoziation) zuzuordnen sind, wird deutlich, dass man neupostulierten Assoziationen bis zu entsprechend mehrfach wiederholten, unabhängigen Bestätigungen mit Vorsicht begegnen sollte. Die deshalb angestrebten großen und zahlreichen Replikationen sind zwar mit einem großen Arbeitsaufwand verbunden, können aber fehlerhafte Ergebnisse verdeutlichen. Die Vorgehensweise, Assoziationen in großen Konsortien zu untersuchen, spiegelt auch den Trend aktueller Assoziationsstudien anderer komplexen Erkrankungen wieder (The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007;

Erdmann *et al.* 2009). Gerade bei der Untersuchung von komplexen Erkrankungen hat sich gezeigt, dass sich nur so relativ kleine aber dennoch funktionell interessante Assoziationen detektieren und bestätigen lassen.

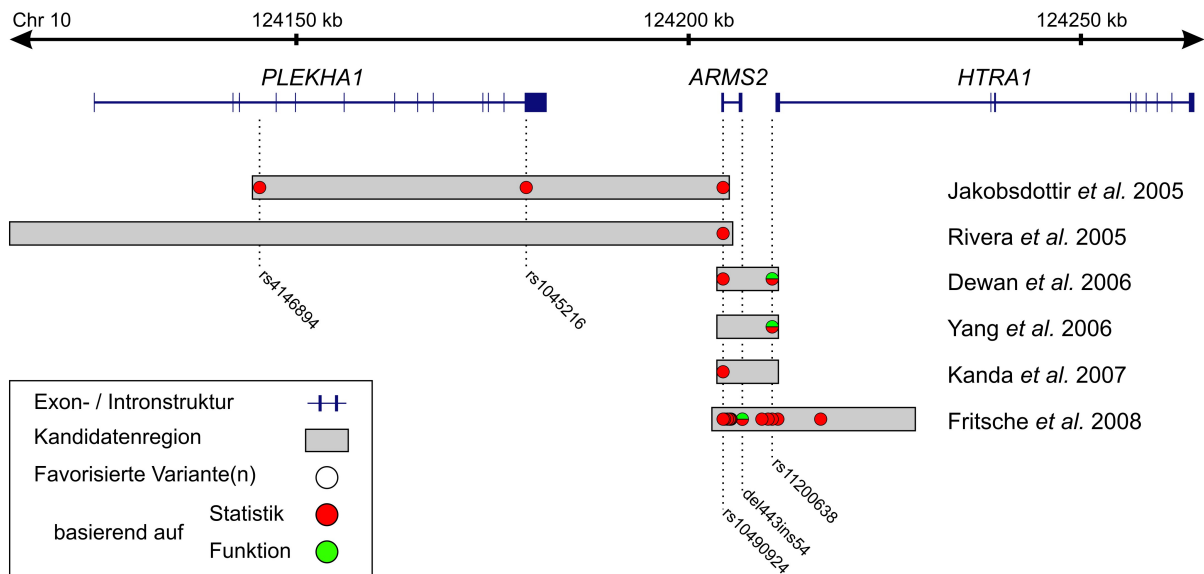
### 3.4 Untersuchungen zur Kandidatenregion 10q23.33–10qter (Rivera *et al.* 2005; Fisher *et al.* 2007; Fritsche *et al.* 2008)

Neben der Chromosomenregion 1q31 wurden in klassischen familienbasierten AMD-Kopplungsanalysen eine Vielzahl von weiteren AMD-Suszeptibilitätsloci beschrieben (Klein *et al.* 1998; Weeks *et al.* 2000; Weeks *et al.* 2001; Majewski *et al.* 2003; Schick *et al.* 2003; Seddon *et al.* 2003; Iyengar *et al.* 2004; Kenealy *et al.* 2004; Weeks *et al.* 2004), wobei eine anschließende Meta-Analyse lediglich für die Chromosomenregion 10q23.33–10qter eine genomweite Signifikanz aufzeigte (Fisher *et al.* 2005). Mittels einer SNP-Feinkartierung konnte dieses Kopplungssignal nachfolgend auf eine kleine Region eingegrenzt werden, welche die drei Gene *PLEKHA1* (*pleckstrin homology domain containing, family A member 1*), *ARMS2* (*age-related maculopathy susceptibility 2*; alias *LOC387715*) und *HTRA1* (*high-temperature requirement protein A1*) umfasst. Aufgrund eines starken LDs in dieser Region konnte nicht weiter zwischen diesen Genloci unterschieden werden (Jakobsdottir *et al.* 2005).

Parallel und unabhängig zu den Studien von Jakobsdottir *et al.* (2005) wurde in unserer Arbeitsgruppe eine weitere SNP-Analyse der 22 Mb-großen 10q23.33–10qter-Kandidatenregion durchgeführt, welche ebenfalls das Kopplungssignal eingrenzen konnte.

Zur Feinkartierung des Kopplungssignals in 10q23.33–10qter wurden anhand der Haplotypblockdatenbank von HapMap (HAPMAP) zunächst 93 SNPs mit einer MAF (*minor allele frequency*) größer 20 % ausgewählt. Diese SNPs lagen innerhalb der großen Haplotypblöcke (> 50 kb) der Kandidatenregion. Die Genotypisierung dieser SNPs innerhalb der initialen Fall-Kontroll-Studie, bestehend aus 794 AMD-Patienten und 612 Kontrollpersonen, lieferte drei SNPs, deren Allelhäufigkeiten sich nach Korrektur für multiples Testen signifikant zwischen AMD-Fällen und Kontrollen unterschieden ( $P \leq 3 \times 10^{-5}$ ). Eine mit 13 zusätzlichen SNPs verfeinerte LD-Kartierung dieser Kandidatenregion in 63 Personen (24 AMD-Patienten und 39 Kontrollen) wies auf einen LD-Block von 87 kb hin. Dieser umspannte nur *PLEKHA1* und *ARMS2*, nicht aber das telomerisch gelegene *HTRA1* oder das zentromerisch gelegene *C10orf87* (*chromosome 10 open reading frame 87*) (Abb. 3). Ferner konnte nur ein einzelner Risikohaplotyp gefunden werden (Rivera *et al.* 2005).





**Abbildung 3:** Übersicht der wichtigsten Assoziationsstudien der 10q26-Kandidatenregion (Jakobsdottir *et al.* 2005; Rivera *et al.* 2005; Dewan *et al.* 2006; Yang *et al.* 2006; Kanda *et al.* 2007; Fritsche *et al.* 2008). Die jeweilig identifizierten Risikovarianten sind durch Kreise hervorgehoben, wobei die vermeintlich funktionellen Risikovarianten (rot/grün) gegenüber den rein statistischen relevanten Varianten (rot) favorisiert wurden. Die relativen chromosomalen Positionen der Gene sind am oberen Rand der Grafik angegeben.

Die Resequenzierung dieses LD-Blocks in 24 AMD-Patienten und 8 Kontrollpersonen identifizierte weitere potentielle Risikovarianten. Zur Maximierung der Aussagekraft dieses Ansatzes wurden hierzu AMD-Patienten ausgewählt, die heterozygot (N = 13) oder homozygot (N = 11) für den Risikohaplotyp waren, wohingegen die Kontrollen den Risikohaplotyp nicht besaßen. Insgesamt wurden 15 Varianten detektiert, von denen die beiden häufigen Varianten *PLEKHA1*:rs1045216:A>G [A320T] und *ARMS2*:rs10490924:G>T [A69S] besonders interessant erschienen (Abb. 3), da sie zum einen kodierend waren und zum anderen fast ausschließlich bei Risikohaplotypträgern gefunden wurden (Rivera *et al.* 2005).

Die Analyse dieser beiden SNPs in der initialen Fall-Kontroll-Kohorte zeichnete beide als signifikant mit der AMD assoziiert aus, wobei der Unterschied in den Allelfrequenzen zwischen Fällen und Kontrollen der *ARMS2*:rs10490924:T-Varianten (41,7 % gegenüber 19,6 %;  $P = 3,9 \times 10^{-34}$ ) deutlich signifikanter war als der der *PLEKHA1*:rs1045216:G-Varianten (68,2 % gegenüber 58,5 %,  $P = 1,2 \times 10^{-7}$ ). Eine konditionale SNP-Analyse ergab ferner, dass keine Kombination mit anderen genotypisierten SNPs das Assoziationssignal der A69S-Variante weiter verstärken konnte bzw. dass in Personen,

welche die rs10490924:T-Variante nicht besaßen, keine signifikante Assoziation eines anderen SNPs beobachtet werden konnte. Somit lässt sich das beobachtete Assoziationssignal dieser Region allein durch die A69S-Variante erklären.

Die Replikation in einer unabhängigen, deutschen Studie mit 373 AMD-Patienten und 335 Kontrollen bestätigte die vorgefundenen Allelfrequenzunterschiede von rs10490924:T (46,0 % gegenüber 21,9 %;  $P = 1,2 \times 10^{-21}$ ). In der Gesamtauswertung von Daten aus initialer Studie und Replikationsstudie war das Assoziationssignal erwartungsgemäß deutlich stärker (43,1 % gegenüber 20,3 %;  $P = 8,2 \times 10^{-54}$ ).

Nachfolgende unabhängige Studien bestätigten die Assoziation der A69S-Varianten, wobei daneben auch Hinweise auf ein starkes LD zum telomerisch gelegenen *HTRAI*-Genort gefunden wurden (Conley *et al.* 2006; Dewan *et al.* 2006; Schmidt *et al.* 2006; Yang *et al.* 2006; Francis *et al.* 2007; Kondo *et al.* 2007; Ross *et al.* 2007; Schaumberg *et al.* 2007; Seddon *et al.* 2007; Shuler *et al.* 2007; Tanimoto *et al.* 2007). So wiesen Daten der HapMap-Datenbank auf einen LD-Bereich hin, der vom *ARMS2* bis ins erste *HTRAI*-Intron hineinreichte (The International HapMap Consortium 2005). Ferner identifizierten zwei Studien neben der *ARMS2*-A69S-Variante ein vergleichbar starkes Assoziationssignal der *HTRAI*-Promotorvariante rs11200638:G>A (Dewan *et al.* 2006; Yang *et al.* 2006) (Abb. 3). Um ein genaueres Ausmaß des LD-Bereichs zu bestimmen, haben wir daher eine erneute jedoch größer angelegte Feinkartierung der *PLEKHAI-ARMS2-HTRAI*-Region durchgeführt. Insgesamt wurden fast 1.400 Personen in die erweiterte Studie einbezogen.

Hierzu wurde die 107 kb-große *PLEKHAI-ARMS2-HTRAI*-Region durch 28 häufige SNPs gleichmäßig abgedeckt, welche anschließend in 794 AMD-Patienten und 612 Kontrollpersonen genotypisiert wurden. Mittels LD-Analyse konnte eine neue LD-Region definiert werden, die ähnlich den HapMap-Daten ein 23 kb-Intervall von *ARMS2* bis zur Hälfte des ersten *HTRAI*-Introns umfasste (Abb. 3). Innerhalb dieses Bereichs befanden sich neben der *ARMS2*-A69S-Varianten und dem *HTRAI*-Promotor-SNP rs11200638, drei weitere stark assoziierte und gekoppelte SNPs (rs3750848, rs3793917, und rs932275;  $10^{-27} > P > 10^{-29}$ ;  $r^2 > 0,88$ ). Zudem ließ die Haplotypanalyse erneut nur einen einzigen Risikohaplotyp erkennen, der zudem exklusiv alle fünf Risikoallele trug (Fritsche *et al.* 2008).

Um weitere Hoch-Risikovarianten zu identifizieren, die ausschließlich auf diesem Risikohaplotyp liegen, wurde die 23 kb-Region bei 16 unverwandten Personen

resequenziert. Durch Auswahl von fünf homozygoten und sechs heterozygoten Risikohaplotypträgern, sowie fünf Nicht-Risikohaplotypträgern, wurde eine höhere Aussagekraft gewährleistet.

Insgesamt wurden neben den fünf bereits bekannten Hoch-Risikovarianten 10 weitere gekoppelte Varianten identifiziert (Abb. 3). Funktionell besonders interessant erschien hierbei eine Insertions-Deletions-(Indel)-Variante (NM\_001099667.1: c.\*372\_815del443ins54), bei der 443 bp des 3'-nicht-translatierten Bereichs einschließlich des Polyadenylierungssignals des *ARMS2*-Gen fehlen. Stattdessen befindet sich dort eine 54 bp-Insertion mit Sequenzmotiven, die als destabilisierende RNA-Elemente bekannt sind (Barreau *et al.* 2005; Khabar 2005; Garneau *et al.* 2007; Fritsche *et al.* 2008).

Durch Genotypisierung dieser Indel-Variante in 794 AMD-Patienten und 612 Kontrollpersonen konnte dessen starke Kopplung zur *ARMS2*-A69S-Variante und zum *HTRA1*-Promotor-SNP rs11200638 verifiziert werden ( $r^2 > 0,99$  bzw.  $r^2 > 0,92$ ) (Fritsche *et al.* 2008). Für eine Schätzung der entsprechenden Effekte war dementsprechend die vorausgegangene Analyse der *ARMS2*-A69S-Variante von Rivera *et al.* (2005) für alle drei putativ funktionellen Risikovarianten und auch für die anderen 12 Hoch-Risikovarianten ( $r^2 = 1$  in 16 Personen) hinreichend repräsentativ. So wiesen Schätzungen des Effekts in der Gesamtstudie (1.120 AMD-Patienten und 922 Kontrollpersonen) heterozygoten Trägern der Ser69-Variante ein ungefähr 2,7-fach erhöhtes, homozygoten Trägern ein 8,2-fach erhöhtes AMD-Risiko aus. Ferner ergaben sich in einer AMD-Untergruppen-Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen AMD-Patienten mit „feuchter“ oder „trockener“ AMD.

Die ebenfalls durchgeführte Replikation der zuvor gefundenen Assoziation mit *CFH* (Edwards *et al.* 2005; Hageman *et al.* 2005; Haines *et al.* 2005; Klein *et al.* 2005) ließ eine vergleichbare Signalstärke der *CFH*-His402-Variante von Chromosom 1q31 (60,2 % in AMD-Patienten gegenüber 37,4 % in Kontrollpersonen;  $P = 2,6 \times 10^{-49}$ ) mit der *ARMS2*-Ser69-Variante erkennen (Rivera *et al.* 2005). So ergaben sich für dessen heterozygote Träger ein zweifach, für dessen homozygote Träger ein 6,7-fach erhöhtes AMD-Risiko. Des Weiteren konnte abgeleitet werden, dass die *CFH*-His402- und die *ARMS2*-Ser69-Variante unabhängig voneinander und additiv zu einem erhöhten AMD-Risiko beitragen. Infolgedessen steigt das AMD-Risiko proportional mit der Anzahl der Risikovarianten. So besitzen z.B. Personen die homozygot für beide Risikovarianten sind (ca. 0,5 % der Bevölkerung) ein annähernd 60-fach höheres Risiko als die niedrigste Risikokategorie (kein

Risikoallel). Die zweithöchste, aber mit ungefähr 4 – 5 % häufigere Risikokategorie (Heterozygotie für ARMS2-Ser69 und Homozygotie für CFH-His402 oder *vice versa*), vermittelt dessen Träger ein 16–20-fach erhöhtes Risiko (Rivera *et al.* 2005).

Interessanterweise zeigten unsere Untersuchungen dieser beiden Polymorphismen in einem russischen Isolat (155 AMD-Patienten und 151 Kontrollpersonen des Nowgorodskaya-Oblasts), dass sich die Effekte der beiden Risikovarianten dort offensichtlich deutlich unterscheiden. Zwar wiesen CFH-His402 (35,7 %) und ARMS2-Ser69 (28,5 %) in den Kontrollgruppen ähnlich hohe Frequenzen wie bei vorangegangenen Studien auf, allerdings wurde nur CFH-His402 (46,8 %) nicht aber ARMS2-Ser69 (31,6 %) signifikant häufiger in der AMD-Gruppe gefunden (Fisher *et al.* 2007).

In der vorgestellten Arbeit konnte das Assoziationssignal von 10q23.33–10qter parallel zu den Arbeiten von Jakobsdottir *et al.* (2005) einer Kandidatenregion auf Chromosom 10q26 zugeordnet werden, welche die Gene *PLEKHA1*, *ARMS2* und *HTRA1* enthält (Rivera *et al.* 2005). Durch eine LD-Kartierung konnte dieses Signal zunächst auf 87 kb und später auf eine etwas telomerisch gelegene 23 kb-Region eingegrenzt werden, die nur das *ARMS2* und das 5'-Ende des *HTRA1*-Gens umfasst (Fritsche *et al.* 2008).

Innerhalb dieser Region wurden insgesamt 15 Varianten gefunden, die aus statistischer Sicht alle mit annähernd gleicher Wahrscheinlichkeit für eine funktionelle Variante in Frage kommen, da sie sich alle auf einem einzigen häufigen Risikohaplotyp befinden. Aufgrund der entsprechend starken Kopplung dieser 15 Varianten, wären im Vergleich zu den vorliegenden Studien sehr viel größere Stichproben nötig, um die wahrscheinlichste Risikovariante herauszufiltern. Dessen ungeachtet könnte eine solche Statistik keine endgültigen Rückschlüsse auf die tatsächliche Funktionalität einer Variante liefern.

Nichtsdestotrotz zeigte die ARMS2-Ser69-Variante stellvertretend für alle 14 weiteren Risikovarianten eine vergleichbare Effektstärke und Häufigkeit wie die vermeintlich funktionelle CFH-His402-Variante. Die *ARMS2/HTRA1*-Region stellt somit einen zweiten unabhängigen und hauptverantwortlichen AMD-Suszeptibilitätslocus in kaukasischen Bevölkerungen dar (Fritsche *et al.* 2008). Diese Assoziation findet sich auch in asiatischen Bevölkerungen (Conley *et al.* 2006; Schmidt *et al.* 2006; Francis *et al.* 2007; Kondo *et al.* 2007; Ross *et al.* 2007; Schaumberg *et al.* 2007; Seddon *et al.* 2007; Shuler *et al.* 2007; Tanimoto *et al.* 2007). Allerdings zeigte die Studie des Nowgorodskaya-Oblast-Isolats, dass isolierte Bevölkerungsgruppen durchaus spezifische Risikofaktoren besitzen können und

somit selbst häufig vorkommende Hochrisikovarianten dort nur eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen (Fisher *et al.* 2007).

### 3.5 Funktionelle Untersuchungen zu AMD-Kandidatengenen

#### 3.5.1 *ARMS2* (Rivera *et al.* 2005; Fritsche *et al.* 2008)

Das *ARMS2*-Gen hatte bis 2005 einen Annotationsstatus eines hypothetischen Gens (*LOC387715*), von dem in den Datenbanken nur eine mRNA-Sequenz und 16 ESTs (*expressed sequence tags*) zu finden waren. Zwar ließ sich anhand der 818 bp-langen cDNA-Sequenz ein offener Leserahmen identifizieren, welcher für ein 107 Aminosäurelanges Protein kodiert, jedoch besitzt dieses keinerlei Homologien zu bereits bekannten Proteinen oder Proteindomänen. Daher war bis dato kein Rückschluss auf dessen Funktion möglich.

Eine RT-(*real time*)-PCR-Analyse in sechs verschiedenen Geweben (Retina, RPE, Plazenta, Grimmdarm, Kleinhirn und Blutleukozyten) zeigte eine *ARMS2*-Expression nur in Plazenta und schwach in der Retina. Somit deutete die korrekt gespleißte und darstellbare mRNA für *ARMS2* trotz schwacher Expression eine mögliche, wenn auch nicht spezifische Funktion in der Retina an (Rivera *et al.* 2005).

Die gefundene Indel-Variante (NM\_001099667.1: c.\*372\_815del443ins54) im 3'-nicht translatierten Bereich von *ARMS2* ließ funktionelle Konsequenzen für dessen Expression vermuten. Einerseits sollte der resultierenden mRNA-Isoform das Polyadenylierungssignal fehlen und zum anderen sollte sie aufgrund der Insertion von 54 Basen destabilisierende RNA-Sequenzelemente („AUUUA“) enthalten (Barreau *et al.* 2005; Khabar 2005; Garneau *et al.* 2007). Ausgehend von diesen Überlegungen wurde daher die Hypothese eines beschleunigten Abbaus der *ARMS2*-mRNA aufgestellt und experimentell untersucht (Fritsche *et al.* 2008).

Expressionsanalysen von retinalem und plazentalem Gewebe zeigten, dass das Transkript der *ARMS2*-mRNA-Isoform des Riskohaplotyps im Gegensatz zur Wildtypisoform *in vivo* tatsächlich nicht darstellbar ist. Darüber hinaus konnte anhand von zwei Expressionsvektor-Konstrukten, die neben der cDNA der beiden *ARMS2*-Isoformen starke Transkriptionsstart und -terminationssignale enthielten, eine verminderte Expression der Risikoisoform gegenüber der Wildtypisoform auch *in vitro* festgestellt werden. Im Gegensatz zur Wildtypisoform, die im Northern-Blot entsprechend der vorhandenen Transkriptionssignale RNA-Banden aufwies, zeigte die Risikoisoform deutlich reduzierte bzw. abwesende RNA-Expression. Das Fehlen des Polyadenylierungssignals schien somit nicht die alleinige

Ursache der verminderten Expression zu sein, da in diesem Experiment alternativ das starke Polyadenylierungssignal des Expressionsvektors zur Verfügung stand (Fritsche *et al.* 2008). In Western-Blot-Analysen konnte mittels eines polyklonalen ARMS2-Antikörpers auch die ARMS2-Proteinexpression in Retina und Plazenta, entsprechend der mRNA-Expression, festgestellt werden. Ferner wurden Plazenten mit entsprechenden Indel-Genotypen ( $3 \times -/-$ ,  $3 \times -/\text{indel}$  und  $1 \times \text{indel/indel}$ ) auf ihre ARMS2-Proteinexpression untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das ARMS2-Protein nur in Plazenten darstellbar war, die heterozygot für die Indel-Variante waren oder diese nicht besaßen.

Immunhistologische Untersuchungen an menschlichen Netzhautschnitten konnten darüber hinaus zeigen, dass ARMS2 in den Innensegmenten von Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren lokalisiert ist. Insbesondere konnten Kolorisierungsfärbungen mit mitochondrialen Markern ARMS2 spezifisch in der sogenannten Ellipsoidregion der Photorezeptorinnensegmente nachweisen. Somit konnte der zuvor erhobene Befund einer, mitochondrialen Lokalisierung des ARMS2-Proteins (Kanda *et al.*, (2007) bestätigt werden. Interessanterweise wird seit einigen Jahren ein möglicher Zusammenhang zwischen beeinträchtigter mitochondrialer Funktion und AMD-Pathogenese vermutet. Dieses Konzept beruht wesentlich auf der Tatsache, dass Mitochondrien für oxidativen Stress, wie er ursächlich für die AMD Pathogenese diskutiert wird, sehr anfällig sind und dadurch altersbedingt somatische Mutationen anhäufen. Auf diese Weise könnte die Mitochondrienfunktion beeinträchtigt werden, was wiederum zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und zur Aktivierung von apoptotischen Prozessen führen könnte (Zarbin 2004; Kanda *et al.* 2007; Jarrett *et al.* 2008).

Die erhobenen Expressionsdaten der del443ins54-Variation legten nahe, dass ein erhöhter mRNA-Umsatz bzw. das Fehlen von ARMS2 für das erhöhte AMD-Risiko verantwortlich sein könnte. Gegen die Rolle des ARMS2-Proteins bei der AMD spricht allerdings das Vorhandensein einer häufigen Stopp-Mutation im *ARMS2*-Gen (rs2736911, R38X), die in 17 % der Bevölkerung gefunden werden kann. Diese Stopp-Mutation wurde auf einem anderen, Nicht-Risiko-assoziierten Haplotyp gefunden und würde entweder zu einem um über 60 % verkürzten Protein oder zum Abbau der entsprechenden mRNA-Isoform durch „nonsense-mediated mRNA decay“ (NMD) führen (Chang *et al.* 2007). Letzteres scheint allerdings wahrscheinlicher, da sich das vorzeitige Stopp-Codon 186 Nukleotide *upstream* des letzten Introns befindet und NMD für gewöhnlich bereits bei 55 Nukleotiden ausgelöst wird (Zhang *et al.* 1998). Der entsprechende Haplotyp weist in der Normalbevölkerung mit

ungefähr 15 % eine ähnliche Häufigkeit wie der Risikohaplotyp (ca. 18 %) auf, geht erstaunlicherweise jedoch nicht mit einem erhöhten, sondern mit einem unveränderten bis erniedrigten AMD-Risiko einher. Das Fehlen des ARMS2-Proteins scheint also das AMD-Risiko nicht zu verändern, womit das Modell der Proteindefizienz als Ursache der AMD fraglich ist. Sollte der Mangel bzw. das Fehlen des Proteins das AMD-Risiko erhöhen, dann sollte auch dieser Haplotyp in AMD-Patienten angereichert sein. Allerdings sind diese Einwände gegen die Rolle des ARMS2-Proteins bis zur experimentellen Bestätigung der Auswirkungen der Stopp-Varianten theoretischer Natur. So könnte die Stopp-Variante anderen Mechanismen, wie z.B. einer Stopp-Codon-Durchlässigkeit oder alternativem Spleißen unterliegen (Allikmets and Dean 2008; Fritsche *et al.* 2008).

Die formale Unterscheidung, ob *ARMS2* oder *HTRA1* das gesuchte AMD-Suszeptibilitätsgen ist, lässt sich nach aktuellem Stand der Forschung nicht treffen, da beide Gene plausible funktionelle Varianten aufweisen, welche sich zudem statistisch nicht differenzieren lassen.

Vorstellbar ist, dass Elemente des *ARMS2*-Genorts die Transkription des 5 kb *downstream* liegenden *HTRA1* beeinflussen. Interessanterweise enthält das inserierte 54 bp-Fragment der Indel-Variante neben den RNA-destabilisierenden Elementen auch potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen, die bislang nicht charakterisiert wurden. Abgesehen hiervon kommen auch die weiteren gekoppelten Hoch-Risikovarianten als potentiell funktionelle Kandidaten in Frage, die bisher ebenfalls nicht experimentell untersucht wurden.



### 3.5.2 Komplementfaktoren und -komponenten (Skerka *et al.* 2007; Scholl *et al.* 2008)

Im Vergleich zur 10q26-Kandidatenregion scheinen die Ergebnisse im Bereich 1q31 eindeutiger, da die stärksten Assoziationssignale über einem einzelnen Gen, nämlich *CFH*, beobachtet werden. Zudem scheint die Rolle von CFH im Signalweg der alternativen Komplementkaskade bei der angeborenen Immunität einen plausiblen Krankheitsmechanismus in der AMD-Ätiologie anzudeuten (Edwards *et al.* 2005; Hageman *et al.* 2005; Haines *et al.* 2005; Klein *et al.* 2005). Bemerkenswerterweise wurden Anzeichen von Entzündungsreaktionen bereits vor über 20 Jahren in der Netzhaut von AMD-Patienten beobachtet und als Ursache der AMD diskutiert (Penfold *et al.* 1984; Penfold *et al.* 1985; Penfold *et al.* 1986). Als Folge der jüngsten Befunde im *CFH*-Gen kam eine Vielzahl weiterer Komplement-Gene in den Fokus von AMD-Kandidatengenstudien. So konnten bisher zwei weitere AMD-Suszeptibilitätsloci, nämlich *C3* (*complement component 3*) und *CFB/C2* (*complement factor B / complement component 2*), untersucht und deren Rolle in der AMD-Pathogenese bestätigt werden (Gold *et al.* 2006; Maller *et al.* 2007; Spencer *et al.* 2007; Yates *et al.* 2007; Jakobsdottir *et al.* 2008).

Das CFH-Protein stellt den Hauptregulator des alternativen, Antikörper-unabhängigen Wegs der Komplementkaskade dar, wobei es gelöst im Serum körpereigene Zellen und Oberflächen bindet (Sivaprasad and Chong 2006). Hier hemmt CFH die Bildung bzw. Aktivierung der C3-Konvertase C3bBb und sorgt als Kofaktor für die Faktor I-vermittelte Inaktivierung von C3b, einem spontanen Spaltprodukt von C3. In Abwesenheit von Faktor H kann C3b Faktor B binden und durch Faktor D zur C3-Konvertase C3bBb umgewandelt werden. Diese kann wiederum zur Aktivierung der C5-Konvertase und letztendlich zur Bildung des C5b-9-Membranangriffkomplexes führen. Da C3 und CFB in diesem Prozess unmittelbare Aktivatoren bzw. Komponenten der C3-Konvertase C3bBb repräsentieren, ist deren ebenfalls beobachtete Assoziation mit der AMD nicht überraschend.

Basierend auf der Hypothese, dass eine Disregulation des alternativen Komplementsystems eine Ursache der AMD darstellt, wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Universitäts-Augenklinik Bonn und des Zentrums für Hygiene und Humangenetik der Universität Göttingen, 112 AMD-Patienten und 67 Kontrollpersonen auf Plasmakonzentrationsunterschiede von Komplementfaktoren und deren Spaltprodukte untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die beiden wichtigsten Biomarker der chronischen Komplementaktivierung, C3d und Ba, bei AMD-Patienten im Vergleich zu

Kontrollpersonen signifikant höhere Konzentrationen aufwiesen ( $P < 0,001$ ). Ferner zeigten auch die relativ schnell abgebauten Anaphylatoxine C3a und C5a, beides *downstream*-Moleküle von Faktor B und C3, höhere Konzentrationen in AMD-Patienten ( $P < 0,04$ ). Die festgestellte Komplementaktivierung ließ sich aber nicht auf erhöhte Konzentrationen von CFH, C3 oder C4 zurückführen, da diese keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufwiesen. Allerdings wurde eine deutlich Konzentration von Faktor D in Patienten festgestellt ( $P < 0,001$ ) (Scholl *et al.* 2008).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den identifizierten Biomarkern und den bekannten genetischen Risikovarianten von *CFH*, *C3* und *CFB/C2* zu detektieren, wurden 12 SNPs dieser Gene in der Fall-Kontroll-Studie genotypisiert (Scholl *et al.* 2008). Analog zu vorherigen Studien zeigten sieben SNPs (*CFH*: rs1061170, rs2274700, rs412852; *C2*: rs547154, rs12614, rs641153; *C3*: rs2230199) eine signifikante Assoziation mit der AMD ( $P < 0,05$ ). Darüber hinaus konnte für die gesteigerte Komplementaktivierung eine statistisch signifikante Korrelation zum einzigen *CFH*-Risikohaplotyp, nicht aber zu *CFB/C2* und *C3*-Markern, gefunden werden (Scholl *et al.* 2008).

Mittels logistischer Regressionsanalyse wurde ferner die Vorhersagequalität von SNPs und Biomarkern verglichen. Hierbei erwiesen sich die drei SNPs *CFH*:rs2274700, *C2*:rs547154 und *C3*:rs2230199 als beste genetische Prädiktoren des AMD-Risikos. Bei den Biomarkern waren dies Ba, C3d und Faktor D, wobei deren Abgrenzungsgenauigkeit im Vergleich zu den genetischen Markern höher war. Diese ließ sich durch Miteinbeziehung der genetischen Marker nur noch geringfügig steigern (Scholl *et al.* 2008).

Der tatsächliche Nutzen der untersuchten Biomarker als Risikoprädiktoren für Frühformen der AMD gegenüber bzw. gemeinsam mit genetischen Markern wird sich allerdings erst anhand prospektiver Studien ermitteln lassen. Darüber hinaus ist eine Steigerung der Aussagequalität durch Miteinbeziehung der genetischen, Komplement-unabhängigen Risikovarianten, wie die der Genorte von *ARMS2/HTRA1* und *APOE*, sehr wahrscheinlich.

In der Studie von Scholl *et al.* (2008) konnte zum ersten Mal eine gesteigerte, systemische Komplementaktivierung in AMD-Patienten gegenüber Kontrollpersonen festgestellt werden und somit ergänzend zu den histologischen Untersuchungen, die Komplementkomponenten in Drusen identifizierten (Johnson *et al.* 2001; Gold *et al.* 2006), ein direkter Zusammenhang zwischen Komplementaktivierung und AMD hergestellt werden. Interessanterweise wurde die Steigerung nicht nur bei AMD-Patienten, sondern auch spezifisch für *CFH*-Risikohaplotypträger festgestellt.

Um den funktionellen Beweis für die favorisierte Risikovariante CFH-Y402H zu erbringen, wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Jenaer Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (Leitung Prof. Dr. Peter Zipfel) die Auswirkungen des Aminosäureaustausches auf die Bindungseigenschaften des CFH-Proteins untersucht. Da der Y402H-Autausch sich im neunten Exon des *CFH*-Gens befindet, ist neben CFH auch das alternative Spleißprodukt FHL-1-(*Factor H-like protein 1*) betroffen. In beiden Proteinen ist das 7. SCR (*short consensus repeat*) betroffen, welches unter anderem für die Bindung von CRP (*C-reactive protein*) und Heparin verantwortlich ist (Kuhn *et al.* 1995; Giannakis *et al.* 2003).

Über molekulare Modellierung konnte zunächst der Aminosäurerest 402 an der Proteinoberfläche der SCR-Domäne lokalisiert werden. Außerdem deutete hierbei der gegenüber dem Tyr402 reduzierte Platzbedarf von His402 eine weniger stark exponierte Oberflächenlokalisierung und dadurch reduzierte Ligandenbindung an (Skerka *et al.* 2007). Immunhistochemische Analysen verifizierten die CFH- und FHL-1-Expression im Auge, insbesondere in RPE-Zellen und Drusen. Hierbei zeigte sich auch, dass RPE-Zellen in der Lage sind beide Proteinisoformen zu sezernieren.

Zur Charakterisierung der Y402H-Varianten wurden die drei möglichen Proteinisoformkombinationen CFH<sub>YY402</sub>, CFH<sub>YH402</sub> und CFH<sub>HH402</sub> aus AMD-Patientenplasma isoliert. Die entsprechenden Proteine wurden anschließend auf ihre Bindung von C3b, CRP und Heparin untersucht. In ELISA-(*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)-Experimenten zeigte sich, dass die Risikoisoformen von CFH als auch von FHL-1 signifikant reduzierte Affinitäten für Heparin und CRP aufwiesen. Die Bindung von C3b schien sich zwischen den Isoformen jedoch nicht zu unterscheiden (Skerka *et al.* 2007).

Interessanterweise wurde im Vergleich zur protektiven CFH<sub>YY402</sub>-Varianten eine signifikant reduzierte Bindung der Risikovarianten CFH<sub>YH402</sub> und CFH<sub>HH402</sub> an RPE- und Endothelzellen detektiert. Zwar wurden für CFH und FHL-1 in der flüssigen Phase identische Kofaktoraktivitäten bei den drei jeweiligen Isoformen festgestellt, allerdings ergaben sich unterschiedliche Zellbindungseigenschaften, die funktionell entscheidend sein könnten. Nachfolgend wurde deshalb die regulatorische Aktivität von FHL-1 an CHO-(*chinese hamster ovary*)-Zelloberflächen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die FHL-1<sub>Tyr402</sub> und die FHL-1<sub>His402</sub>-Isoform dort zwar ähnliche Kofaktoraktivitäten besaßen, Letztere jedoch eine reduzierte Komplementinaktivierung bzw. -regulation offenbarte (Skerka *et al.* 2007).

Die vorgefundenen Ergebnisse zeigten neben des bereits bekannten Einflusses der CFH-Isoformen auf die Heparinbindung (Clark *et al.* 2006) auch eine eingeschränkte CRP-Bindung der CFH-Risikoisoform. Darüber hinaus konnten diese Bindungsunterschiede auch für die FHL-1-Proteinisoformen gezeigt werden. Die festgestellten Zell-Bindungseigenschaften und die damit einhergehende reduzierte Regulierung durch die Risikovariante His402 unterstützen somit die bisherige Hypothese einer chronisch gesteigerten Komplementaktivierung bei der AMD.

Die AMD wird bereits seit einigen Jahren als Entzündungskrankheit betrachtet, da in ihren charakteristischen Drusen mittels immunhistochemischer und proteomischer Analysen neben immunkompetenten Zellen, zahlreiche Komplementaktivatoren und -regulatoren gefunden wurden (Penfold *et al.* 1985; Anderson *et al.* 2002; Bok 2005; Provis *et al.* 2005). Ferner wird angenommen, dass altersbedingte Lipofuszinablagerungen hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Neben ihres zytotoxischen Potentials stehen sie unter dem Verdacht die Komplementkaskade zu aktivieren (Zhou *et al.* 2009). Ein altersabhängiger Zusammenhang zwischen übermäßiger Komplementaktivierung und AMD-Pathogenese ließe sich somit verstehen und somit die spezielle Rolle der CFH-Y402H-Variante bei der AMD erklären.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Suche nach kausalen AMD-assoziierten Varianten

Mit einer Anzahl von etwa 14,7 Millionen stellen SNPs die häufigste Form genetischer Variation beim Menschen dar (dbSNP Build 129; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Ihre genomweite Verteilung, Stabilität und Häufigkeit sowie deren kostengünstige Bestimmung machen sie zu idealen Markern für genetische Assoziationsstudien. Da SNPs auch in kodierenden Sequenzen, Spleißstellen und Transkriptionsfaktorbindestellen vorkommen, können sie, falls sie nicht indirekte Assoziationssignale wiedergeben, auch funktionell sein.

Idealerweise führen SNP-Assoziationsstudien zu einer einzelnen, funktionellen Risikovariante mit herausragender Signalstärke. Wie jedoch am Beispiel des Suszeptibilitätslocus *ARMS2 – HTRA1* zu sehen ist, finden sich häufig Situationen, bei denen keine statistische Trennung der Signale möglich ist, sondern mehrere Varianten nicht auflösbar nebeneinander stehen (Fritsche *et al.* 2008). Letztendlich bedarf es eines funktionellen Beweises, der eine endgültige Aussage über eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese der Erkrankung erlaubt. Eine statistische Aussage, die auf einer ausreichend großen Stichprobe beruht, kann hierbei eine Hilfe sein, prinzipiell muss jedoch die Funktion für eine kausale Variante verifiziert und für indirekt assoziierte Variationen falsifiziert werden. Letzteres ist jedoch oft schwer zu erreichen, da mögliche regulatorische Zusammenhänge von SNPs gewebs- und entwicklungsspezifisch sein können und damit experimentell oft nur unzureichend zu überprüfen sind.

Epistatische Effekte lassen sich in Assoziationsstudien ebenfalls schwer fassen. So besteht die Möglichkeit, dass Varianten nur in bestimmten Konstellationen zu einem Phänotyp beitragen, z.B. durch intragenische, differenzielle Expression von Proteinisoformen, wie sich für das *APOE*-Gen vermuten lässt (Fritsche *et al.* 2009). Aktuelle Studien belegen die Relevanz von regulatorischen Effekten (Stranger *et al.* 2007) und schätzen, dass eine differenzielle Expression bei etwa 18 % aller nicht-synonym kodierenden Varianten beobachtet werden kann (Dimas *et al.* 2008). Der Nachweis solcher epistatischer Zusammenhänge ist jedoch aufwendig und bedarf neben einer aussagekräftigen, statistischen Analyse der Haplotypkombinationen auch eines funktionellen Nachweises der vermeintlich regulatorischen SNPs.

Die Bemühungen der Forschung beschränken sich daher in vielen Fällen auf die Identifizierung der Variante mit dem stärksten Assoziationssignal, der plausibelsten Erklärungen und/oder dem stärksten Effekt. Doch selbst diese Strategie kann durch einseitige Favorisierung von Kandidatengen und Überbewertung erhobener funktioneller Daten für zusätzliche Komplexität sorgen, wie am Beispiel des AMD-Suszeptibilitätslocus in 10q26.13 zu erkennen ist. So lässt sich das eigentliche AMD-assoziierte Gen bis heute nicht eindeutig nachweisen, da statistisch nicht zwischen *ARMS2* und *HTRA1* unterschieden werden kann und beide Gene plausible funktionelle Varianten aufweisen (Allikmets and Dean 2008). Gegenwärtig scheinen unsere Ergebnisse *ARMS2* zu favorisieren, insbesondere da die funktionellen Konsequenzen der AMD-assoziierten Deletion/Insertions-Variante am *ARMS2*-Genort den möglichen Auswirkungen von Promotor-SNPs in der regulatorischen Region von *HTRA1* überwiegen sollten (Dewan *et al.* 2006; Fritsche *et al.* 2008). Allerdings konnte der *ARMS2*-mRNA oder dessen Genprodukt bis heute keine Funktion zugeordnet werden. Darüber hinaus existieren 13 weitere Hoch-Risikovarianten die allesamt funktionell sein könnten und noch einer detaillierten Untersuchung bedürfen.

#### **4.2 AMD – Ein Sonderfall unter den komplexen Erkrankungen?**

Betrachtet man die AMD im Vergleich zu anderen komplexen Erkrankungen, so fällt auf, dass bei der AMD klare Phänotypen definiert werden können. Entsprechende Untersuchungsmethoden wie die Funduskopie oder die Fundusautofluoreszenz erlauben eine eindeutige Diagnose in verschiedene Subgruppen der Erkrankung. Anders verhält es sich z.B. bei den Bipolaren Störungen („manisch-depressive Krankheit“). Hier beruht die Diagnose weitestgehend auf Anamnese und Verhaltensbeobachtung. Die Unterscheidung zu anderen Gemütszuständen ist oft schwierig und verursacht diagnostische Ungenauigkeiten. Interessanterweise erhofft man sich bei diesem Krankheitsbild eine Verbesserung der Diagnostik mit Hilfe genetischer Marker. Zwar ist aufgrund von ausgiebigen Zwillingsstudien und Beobachtungen familiärer Häufungen die hohe Heritabilität (80–90%) der Bipolaren Störungen hinreichend gezeigt, jedoch konnte bisher kein hauptverantwortliches Gen identifiziert werden (Escamilla and Zavala 2008). Selbst eine genomweite Assoziationsstudie mit rund 2.000 Patienten und 3.000 Kontrollen konnte neben der Bestätigung einiger minderer Suszeptibilitätsgene, keine weiteren finden (The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007). Vergleicht man dies mit den beiden publizierten, genomweiten AMD-Assoziationsstudien wird der Unterschied deutlich. Im Falle der AMD reichten bereits 96 AMD-Patienten und 50 bzw. 130 Kontrollen aus, um

deutliche Assoziationssignale zu erhalten (Klein *et al.* 2005; Dewan *et al.* 2006), wobei die genomweite Abdeckung der SNP-Marker sogar fünffach geringer war als im Falle der *Wellcome Trust*-Studie (2007).

Auch ein Vergleich mit komplexen Erkrankungen, die ein eindeutiges klinisches Krankheitsbild aufweisen, wie beispielsweise die koronare Herzerkrankung (KHK), zeigt deutlich die herausragende Situation der AMD. So wird für die KHK zwar eine Heritabilität von bis zu 49 % angenommen, jedoch konnte außer einigen minderen Risikogenen bislang kein hauptverantwortliches Gen gefunden werden (Fischer *et al.* 2005; Mayer *et al.* 2007). Der Beitrag der bekannten Risikovarianten zum allgemeinen Krankheitsrisiko ist deutlich geringer als der der traditionellen, seit längerem bekannten, Risikofaktoren, wie z.B. Rauchen, erhöhter Cholesterinspiegel, Übergewicht, Bluthochdruck, und Diabetes mellitus. Ausgehend von aktuellen genomweiten Untersuchungen wird vermutet, dass es keine hauptverantwortlichen, sondern stattdessen eine Vielzahl von geringeren KHK-verursachenden Risikogenen gibt. Falls einige Gene dennoch eine größere Rolle spielen sollten, könnten diese durch epistatische Effekte oder unbekannte Gen-Gen-Interaktionen bislang verborgen geblieben sein. Ferner scheint das genetische KHK-Risiko durch das Zusammenspiel indirekter Risikofaktor-modifizierender Gene (z.B. für Bluthochdruck, Übergewicht) weiter verkompliziert zu sein (Mayer *et al.* 2007).

Die besondere Situation der AMD scheint also neben dessen eindeutig definiertem Krankheitsbild auch die geringere Beteiligung der traditionellen, physiologischen (umweltabhängigen) Risikofaktoren zu sein. Die Heritabilität der AMD ist wohl nicht höher als bei anderen komplexen Erkrankungen, es scheint eher, dass die zugrundeliegenden genetischen Faktoren spezifischer sind. Dieser Zusammenhang wird vor allem deutlich, wenn man aktuelle Schätzungen zu den Beiträgen der bereits identifizierten Risikofaktoren betrachtet. Danach könnten möglicherweise bis zu 76 % des AMD-Risikos durch Rauchen und durch die Varianten der drei Suszeptibilitätsgene *CFH*, *ARMS2*, und *C3* erklärt werden (Spencer *et al.* 2008). Innerhalb der komplexen Erkrankungen findet sich die AMD daher mit wenigen starken, aber häufigen Risikogenvarianten an einem Ende des Spektrums, dem Krankheiten mit vielen schwachen, aber seltenen Risikogenvarianten diametral gegenüberstehen.

### 4.3 Genetische Testung für AMD

Die Identifizierung von starken, AMD-assoziierten Varianten in den beiden Genorten *CFH* und *ARMS2/HTRA1* wurde von wissenschaftlichen aber auch klinischen Gruppen

enthusiastisch aufgenommen, nicht zuletzt da man sich nun in die Lage versetzt sah, eine aussagekräftige AMD-Diagnostik anbieten zu können. Schätzungen der Vorhersagequalität von genetischen Risikovarianten unterstützen diese Hoffnung, da eine Verbesserung gegenüber den traditionellen Risikofaktoren Alter und Rauchen gezeigt werden konnte (Despriet 2008).

Durch die Genotyp-Kombinationen der bekannten Suszeptibilitätsgene, welche das AMD-Risiko wesentlich beeinflussen können, lassen sich eindeutige Risikogruppen bilden. So besitzen beispielsweise Personen die homozygot für die Risikoallele der Gene *CFH*, *ARMS2/HTRA1* und *C2/CFB* sind, ein etwa 14-fach höheres AMD-Risiko im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung. Im Gegensatz dazu weist die Gruppe, die kein einziges dieser Risikoallele trägt, ein 20-fach reduziertes AMD-Risiko auf (Despriet *et al.* 2007). Jedoch sind die an den extremen Enden angesiedelten Genotypen mit unter 3 % eher selten, so dass die meisten Personen in deutlich aussageschwächere Risikokategorien einzuordnen sind. Die tatsächlichen Risiken sind gegenwärtig nicht sicher abzuschätzen, da bisher keine prospektiven Studien zu dieser Fragestellung vorliegen und darüber hinaus andere bisher wenig beachtete Faktoren das Gesamtrisiko verschieben könnten.

Dennoch ist eine diagnostische Testung von Personen von Interesse, zumal solchen mit einem deutlich erhöhten Risiko regelmäßige, ophthalmologische Kontrolluntersuchungen und weitere Maßnahmen für eine frühe Prävention angeboten werden können. Zwar sind therapeutische Optionen bisher in sehr begrenztem Umfang vorhanden, diese Situation könnte sich jedoch aufgrund der neuen genetischen Erkenntnisse mittelfristig verbessern (Fletcher *et al.* 2008).

Eine aktuelle Studie zur Vorhersagequalität von AMD-Hochrisikovarianten konnte zeigen, dass die Verwendung der Risikovarianten von *CFH*, *ARMS2* und *C2* bereits eine hinreichend gute Diskriminierungseigenschaft von AMD-Patienten und Kontrollen zulässt. Allerdings deuten die Ergebnisse auch auf einen extrem hohen Anteil von Kontrollpersonen an, die fälschlicherweise in die Hochrisikogruppe eingestuft werden, welcher sich zudem mit geringerem Alter der Testpersonen und dementsprechend sinkender AMD-Prävalenz deutlich erhöht (Jakobsdottir *et al.* 2009).

Es sollte bei den vorliegenden Risikodaten nicht vergessen werden, dass es sich bei den erhobenen Werten mit großer Wahrscheinlichkeit um Überschätzungen handelt. In der Regel beruhen die Ergebnisse auf Studien, deren Kontrollen zur Maximierung der Aussagekraft selektiert wurden, d.h. anders als die Normalbevölkerung keine klinischen



Auffälligkeiten aufweisen. Darüber hinaus werden die ORs der retrospektiven Assoziationsstudien oftmals mit den relativen Risiken gleichgesetzt, was jedoch strenggenommen nur für Krankheiten mit kleinen Inzidenzraten annähernd genau ist (Deeks 1998). Eine Übertragung der Forschungsdaten auf die Diagnostik eines individuellen Patienten sollte daher mit großer Vorsicht behandelt werden. Die mit den identifizierten Suszeptibilitätsgenen verbundenen Risiken sollten lediglich als Richtungsweiser für die Aufklärung der AMD-Pathogenese und dadurch für die Entwicklung therapeutischen Maßnahmen verstanden werden. Denn auch wenn die AMD-Diagnostik mit Hilfe der molekulargenetischen Testung in Zukunft akkurater sein wird, ist deren Nutzung für den einzelnen Patienten nur in Verbindung mit geeigneten Therapien anzuraten.

#### 4.4 AMD-Therapie

Aktuelle therapeutische Maßnahmen zur Behandlung der AMD konzentrieren sich weitgehend auf neovaskuläre Manifestationen. Bis vor wenigen Jahren bestand hierbei nur die Möglichkeiten der operativen Entfernung oder der Zerstörung von neovaskulären Membranen beispielsweise mittels Photodynamischer Therapie. Die Rezidivrate dieser Behandlungsoption ist allerdings recht hoch (Grisanti and Tatar 2008).

Seit kurzem kommen erfolgreich Therapien zum Einsatz, die den lokalen Entzug des Wachstumsfaktors VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) zum Ziel haben. VEGFA fördert unter anderem die vaskuläre Permeabilität, die Angiogenese, sowie die Vaskularisation. Viele Studien belegen eine Hochregulation von VEGFA bei neovaskulären AMD-Patienten. Ein Entzug bzw. die Blockade des VEGFA-Signalwegs sollte daher das unkontrollierte Wachstum von abnormalen Gefäßen positiv beeinflussen. Aufgrund dieser Überlegung kommen bislang in der Praxis verschiedene Ansätze zur Anwendung, darunter VEGFA-Aptamere, VEGFA-Antikörper, und VEGFA-Antikörperfragmente, die intravitreal, also direkt in den Glaskörper des Auges, injiziert werden. Langfristige negative Nebenwirkungen wurden bisher nicht beobachtet, es konnten jedoch zum Teil erhebliche Verbesserungen des Krankheitsverlaufs mit Rückgang der CNV und einer Verbesserung der Sehkraft verzeichnet werden (Grisanti and Tatar 2008).

Im Vergleich zur CNV gibt es für die häufigere geographische Atrophie bislang keine Therapiemöglichkeiten, jedoch laufen aktuell erste klinische Studien über neue Ansätze, darunter die Transplantation von Kapseln mit modifizierten Zelllinien, die neuroprotektive Faktoren sezernieren (Emerich and Thanos 2008) oder der Einsatz von

Komplementhemmern, z.B. Aptamer gegen Komplementfaktor 5 (C5, Pressemitteilung Ophthotech 28.10.08). Die Erfolge bleiben abzuwarten.

#### 4.5 Ausblick

Genetische AMD-Studien haben mit der Identifizierung der zwei hauptverantwortlichen Genloci *CFH* und *ARMS2/HTRA1* einen ersten Höhepunkt erreicht. Seitdem konnten mit *C3* und *C2/CFB* weitere wichtige Faktoren der AMD-Pathogenese aufgedeckt werden, die eine Beteiligung der angeborenen Immunität bei der Entwicklung der AMD weiter unterstützen.

Die Meta-Analyse von Fisher *et al.* (2005) deutet auf weitere essentielle Kandidatenloci hin, allerdings konnten zusätzliche genomweite Assoziationsstudien diese Orte weder bestätigen, noch neue signifikante Assoziationssignale mit starken Effekten auffinden (Klein *et al.* 2005; Dewan *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2008). Da die genomische Abdeckung der SNPs und der Umfang der genetischen Untersuchungen laufend optimiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass zukünftige Assoziationsstudien selbst mindere bis moderate Suszeptibilitätsgene aufdecken werden, vielleicht sogar in den erwähnten Kandidatenloci. Mithin lässt sich bei den Hochdurchsatz-Genotypisierungen ein Trend erkennen, der von anfangs wenigen hundert bis mittlerweile über eine Millionen SNPs eine immer feiner werdenden Kartierung erlaubt und eventuell in der Sequenzierung von ganzen Patientengenomen gipfeln wird (Buchanan and Scherer 2008; Grant and Hakonarson 2008). Ferner könnte ein vermehrter Trend zu Zusammenschlüssen von Forschergruppen mit dann wesentlich größeren Fall-Kontroll-Kohorten, wie es exemplarisch vom *Wellcome Trust Case Control Consortium* (2007) vorgemacht wurde, zu wesentlich höherer Aussagekraft sowohl bei der Durchsuchung der Patientengenome als auch bei den darauf folgenden Replikationen der Kandidatengene liefern.

Es darf allerdings nicht vergessen werden, dass sich die Forschung erst am Anfang der *Post-Human Genome Project*-Area befindet und die genetischen Variationen des Menschen, sowie daraus sich ergebende Fragen zur Regulation von Genexpressionen, erst in Anfängen verstanden sind. So bleiben Gen-Umwelt- und Gen-Gen-Interaktionen, epigenetische und epistatische Einflüsse, welche entscheidende Faktoren von Krankheitsprozessen sein können, bisher weitestgehend unbeachtet.

Wie am Beispiel der AMD-Suszeptibilitätsgene deutlich wird, stellt die Identifizierungen von Suszeptibilitätsgenen nur den Anfang von aufwendigen und zum Teil sehr langwierigen funktionellen Studien dar. So werden beispielsweise erst zukünftige Untersuchungen zu

*ARMS2* und *HTRA1* das tatsächliche Suszeptibilitätsgen und den entsprechenden Signalweg in der Pathogenese der 10q26-assoziierten AMD entschlüsseln können. Dieser könnte allerdings unabhängig von dem bisher bekannten Weg der angeborenen Immunität sein und somit einen völlig neuen, alternativen Ansatz für Interventionsmaßnahmen bei den Spätformen der AMD liefern.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abecasis G.R., Yashar B.M., Zhao Y., Ghasvand N.M., Zarepari S. *et al.* (2004): *Age-related macular degeneration: a high-resolution genome scan for susceptibility loci in a population enriched for late-stage disease*. Am J Hum Genet 74, 482-94.
- Allikmets R., Bergen A.A., Dean M., Guymer R.H., Hageman G.S. *et al.* (2009): *Geographic atrophy in age-related macular degeneration and TLR3*. N Engl J Med 360, 2252-4.
- Allikmets R. and Dean M. (2008): *Bringing age-related macular degeneration into focus*. Nat Genet 40, 820-1.
- Allikmets R., Dean M., Hageman G.S., Baird P.N., Klaver C.C. *et al.* (2009): *The SERPING1 gene and age-related macular degeneration*. Lancet 374, 875-6.
- Anderson D.H., Mullins R.F., Hageman G.S. and Johnson L.V. (2002): *A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye*. Am J Ophthalmol 134, 411-31.
- Artiga M.J., Bullido M.J., Frank A., Sastre I., Recuero M. *et al.* (1998): *Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene*. Hum Mol Genet 7, 1887-92.
- Artiga M.J., Bullido M.J., Sastre I., Recuero M., Garcia M.A. *et al.* (1998): *Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene*. FEBS Lett 421, 105-8.
- Augood C.A., Vingerling J.R., de Jong P.T., Chakravarthy U., Seland J. *et al.* (2006): *Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE)*. Arch Ophthalmol 124, 529-35.
- Baird P.N., Guida E., Chu D.T., Vu H.T. and Guymer R.H. (2004): *The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci 45, 1311-5.
- Baird P.N., Richardson A.J., Robman L.D., Dimitrov P.N., Tikellis G. *et al.* (2006): *Apolipoprotein (APOE) gene is associated with progression of age-related macular degeneration (AMD)*. Hum Mutat.
- Barreau C., Paillard L. and Osborne H.B. (2005): *AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?* Nucleic Acids Res 33, 7138-50.
- Belbin O., Dunn J.L., Ling Y., Morgan L., Chappell S. *et al.* (2007): *Regulatory region single nucleotide polymorphisms of the apolipoprotein E gene and the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease*. Hum Mol Genet 16, 2199-208.
- Bird A.C., Bressler N.M., Bressler S.B., Chisholm I.H., Coscas G. *et al.* (1995): *An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group*. Surv Ophthalmol 39, 367-74.
- Bojanowski C.M., Shen D., Chew E.Y., Ning B., Csaky K.G. *et al.* (2006): *An apolipoprotein E variant may protect against age-related macular degeneration through cytokine regulation*. Environ Mol Mutagen 47, 594-602.
- Bok D. (2005): *Evidence for an inflammatory process in age-related macular degeneration gains new support*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 7053-4.
- Brunk U.T. and Terman A. (2002): *Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function*. Free Radic Biol Med 33, 611-9.
- Buchanan J.A. and Scherer S.W. (2008): *Contemplating effects of genomic structural variation*. Genet Med 10, 639-47.

- Bullido M.J., Artiga M.J., Recuero M., Sastre I., Garcia M.A. *et al.* (1998): *A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia.* Nat Genet 18, 69-71.
- Campillos M., Lamas J.R., Garcia M.A., Bullido M.J., Valdivieso F. *et al.* (2003): *Specific interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 with the -219T allelic form modulates APOE promoter activity.* Nucleic Acids Res 31, 3063-70.
- Chang Y.F., Imam J.S. and Wilkinson M.F. (2007): *The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway.* Annu Rev Biochem 76, 51-74.
- Clark S.J., Higman V.A., Mulloy B., Perkins S.J., Lea S.M. *et al.* (2006): *His-384 allotypic variant of factor H associated with age-related macular degeneration has different heparin binding properties from the non-disease-associated form.* J Biol Chem 281, 24713-20.
- Conley Y.P., Jakobsdottir J., Mah T., Weeks D.E., Klein R. *et al.* (2006): *CFH, ELOVL4, PLEKHA1 and LOC387715 genes and susceptibility to age-related maculopathy: AREDS and CHS cohorts and meta-analyses.* Hum Mol Genet 15, 3206-18.
- DeAngelis M.M., Ji F., Kim I.K., Adams S., Capone A., Jr. *et al.* (2007): *Cigarette smoking, CFH, APOE, ELOVL4, and risk of neovascular age-related macular degeneration.* Arch Ophthalmol 125, 49-54.
- Deeks J. (1998): *When can odds ratios mislead? Odds ratios should be used only in case-control studies and logistic regression analyses.* BMJ 317, 1155-6; author reply 1156-7.
- Despriet D.D. (2008): *Genetics Of Age-Related Macular Degeneration: New Insights And Perspectives.* Doctoral Thesis, Erasmus University.
- Despriet D.D., Klaver C.C., van Duijn C.C. and Janssens A.C. (2007): *Predictive value of multiple genetic testing for age-related macular degeneration.* Arch Ophthalmol 125, 1270-1.
- Dewan A., Liu M., Hartman S., Zhang S.S., Liu D.T. *et al.* (2006): *HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration.* Science 314, 989-92.
- Dimas A.S., Stranger B.E., Beazley C., Finn R.D., Ingle C.E. *et al.* (2008): *Modifier effects between regulatory and protein-coding variation.* PLoS Genet 4, e1000244.
- Edwards A.O., Ritter R., 3rd, Abel K.J., Manning A., Panhuysen C. *et al.* (2005): *Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration.* Science 308, 421-4.
- Emerich D.F. and Thanos C.G. (2008): *NT-501: an ophthalmic implant of polymer-encapsulated ciliary neurotrophic factor-producing cells.* Curr Opin Mol Ther 10, 506-15.
- Ennis S., Jomary C., Mullins R., Cree A., Chen X. *et al.* (2008): *Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration: a two-stage case-control study.* Lancet 372, 1828-34.
- Erdmann J., Grosshennig A., Braund P.S., Konig I.R., Hengstenberg C. *et al.* (2009): *New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3.* Nat Genet 41, 280-2.
- Escamilla M.A. and Zavala J.M. (2008): *Genetics of bipolar disorder.* Dialogues Clin Neurosci 10, 141-52.
- Fan D., Qiu S., Overton C.D., Yancey P.G., Swift L.L. *et al.* (2007): *Impaired secretion of apolipoprotein E2 from macrophages.* J Biol Chem 282, 13746-53.
- Fischer M., Broeckel U., Holmer S., Baessler A., Hengstenberg C. *et al.* (2005): *Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction.* Circulation 111, 855-62.

- Fisher S.A., Abecasis G.R., Yashar B.M., Zarepari S., Swaroop A. *et al.* (2005): *Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration*. Hum Mol Genet 14, 2257-64.
- Fisher S.A., Rivera A., Fritsche L.G., Babadjanova G., Petrov S. *et al.* (2007): *Assessment of the contribution of CFH and chromosome 10q26 AMD susceptibility loci in a Russian population isolate*. Br J Ophthalmol 91, 576-8.
- Fisher S.A., Rivera A., Fritsche L.G., Keilhauer C.N., Lichtner P. *et al.* (2007): *Case-control genetic association study of fibulin-6 (FBLN6 or HMCN1) variants in age-related macular degeneration (AMD)*. Hum Mutat 28, 406-13.
- Fletcher A.E., Bentham G.C., Agnew M., Young I.S., Augood C. *et al.* (2008): *Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration*. Arch Ophthalmol 126, 1396-403.
- Francis P.J., George S., Schultz D.W., Rosner B., Hamon S. *et al.* (2007): *The LOC387715 gene, smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration*. Hum Hered 63, 212-8.
- Fritsche L.G., Freitag-Wolf S., Bettecken T., Meitinger T., Keilhauer C.N. *et al.* (2009): *Age-related macular degeneration and functional promoter and coding variants of the apolipoprotein E gene*. Hum Mutat 30, 1048-53.
- Fritsche L.G., Loenhardt T., Janssen A., Fisher S.A., Rivera A. *et al.* (2008): *Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA*. Nat Genet 40, 892-6.
- Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., Roy J. *et al.* (2002): *The structure of haplotype blocks in the human genome*. Science 296, 2225-9.
- Garneau N.L., Wilusz J. and Wilusz C.J. (2007): *The highways and byways of mRNA decay*. Nat Rev Mol Cell Biol 8, 113-26.
- Gehrs K.M., Anderson D.H., Johnson L.V. and Hageman G.S. (2006): *Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts*. Ann Med 38, 450-71.
- Giannakis E., Jokiranta T.S., Male D.A., Ranganathan S., Ormsby R.J. *et al.* (2003): *A common site within factor H SCR 7 responsible for binding heparin, C-reactive protein and streptococcal M protein*. Eur J Immunol 33, 962-9.
- Gold B., Merriam J.E., Zernant J., Hancox L.S., Taiber A.J. *et al.* (2006): *Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration*. Nat Genet 38, 458-62.
- Gotoh N., Kuroiwa S., Kikuchi T., Arai J., Arai S. *et al.* (2004): *Apolipoprotein E polymorphisms in Japanese patients with polypoidal choroidal vasculopathy and exudative age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol 138, 567-73.
- Grant S.F. and Hakonarson H. (2008): *Microarray technology and applications in the arena of genome-wide association*. Clin Chem 54, 1116-24.
- Grisanti S. and Tatar O. (2008): *The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration*. Prog Retin Eye Res 27, 372-90.
- Haddad S., Chen C.A., Santangelo S.L. and Seddon J.M. (2006): *The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date*. Surv Ophthalmol 51, 316-63.
- Hageman G.S., Anderson D.H., Johnson L.V., Hancox L.S., Taiber A.J. *et al.* (2005): *A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 7227-32.

- Haines J.L., Hauser M.A., Schmidt S., Scott W.K., Olson L.M. *et al.* (2005): *Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration*. Science 308, 419-21.
- Hayashi M., Merriam J.E., Klaver C.C., Zernant J., Bergen A.A. *et al.* (2004): *Evaluation of the ARMD1 locus on 1q25-31 in patients with age-related maculopathy: genetic variation in laminin genes and in exon 104 of HEMICENTIN-1*. Ophthalmic Genet 25, 111-9.
- Heinemann E. (1992). Dichtung als Wunscherfüllung. Ubstadt Karl Serden, im Auftrag der Karl-May- Gesellschaft e.V.
- Hui D.Y. (2004): *Apolipoprotein E-induced cell signaling in the vessel wall*. Rev Endocr Metab Disord 5, 335-41.
- Iyengar S.K., Song D., Klein B.E., Klein R., Schick J.H. *et al.* (2004): *Dissection of genomewide-scan data in extended families reveals a major locus and oligogenic susceptibility for age-related macular degeneration*. Am J Hum Genet 74, 20-39.
- Jakobsdottir J., Conley Y.P., Weeks D.E., Ferrell R.E. and Gorin M.B. (2008): *C2 and CFB genes in age-related maculopathy and joint action with CFH and LOC387715 genes*. PLoS ONE 3, e2199.
- Jakobsdottir J., Conley Y.P., Weeks D.E., Mah T.S., Ferrell R.E. *et al.* (2005): *Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26*. Am J Hum Genet 77, 389-407.
- Jakobsdottir J., Gorin M.B., Conley Y.P., Ferrell R.E. and Weeks D.E. (2009): *Interpretation of genetic association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers*. PLoS Genet 5, e1000337.
- Jarrett S.G., Lin H., Godley B.F. and Boulton M.E. (2008): *Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration*. Prog Retin Eye Res 27, 596-607.
- Johnson G.C., Esposito L., Barratt B.J., Smith A.N., Heward J. *et al.* (2001): *Haplotype tagging for the identification of common disease genes*. Nat Genet 29, 233-7.
- Johnson L.V., Leitner W.P., Staples M.K. and Anderson D.H. (2001): *Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration*. Exp Eye Res 73, 887-96.
- Kanda A., Chen W., Othman M., Branham K.E., Brooks M. *et al.* (2007): *A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 16227-32.
- Kenealy S.J., Schmidt S., Agarwal A., Postel E.A., De La Paz M.A. *et al.* (2004): *Linkage analysis for age-related macular degeneration supports a gene on chromosome 10q26*. Mol Vis 10, 57-61.
- Khabar K.S. (2005): *The AU-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease*. J Interferon Cytokine Res 25, 1-10.
- Klaver C.C., Kliffen M., van Duijn C.M., Hofman A., Cruts M. *et al.* (1998): *Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration*. Am J Hum Genet 63, 200-6.
- Klein M.L., Mauldin W.M. and Stoumbos V.D. (1994): *Heredity and age-related macular degeneration. Observations in monozygotic twins*. Arch Ophthalmol 112, 932-7.
- Klein M.L., Schultz D.W., Edwards A., Matise T.C., Rust K. *et al.* (1998): *Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q*. Arch Ophthalmol 116, 1082-8.
- Klein R.J., Zeiss C., Chew E.Y., Tsai J.Y., Sackler R.S. *et al.* (2005): *Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration*. Science 308, 385-9.

- Kondo N., Honda S., Ishibashi K., Tsukahara Y. and Negi A. (2007): *LOC387715/HTRA1 variants in polypoidal choroidal vasculopathy and age-related macular degeneration in a Japanese population*. Am J Ophthalmol 144, 608-12.
- Kuhn S., Skerka C. and Zipfel P.F. (1995): *Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1*. J Immunol 155, 5663-70.
- Lambert J.C., Berr C., Pasquier F., Delacourte A., Frigard B. et al. (1998): *Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease*. Hum Mol Genet 7, 1511-6.
- Lambert J.C., Pasquier F., Cotel D., Frigard B., Amouyel P. et al. (1998): *A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease*. Hum Mol Genet 7, 533-40.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C. et al. (2001): *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature 409, 860-921.
- Liang F.Q. and Godley B.F. (2003): *Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration*. Exp Eye Res 76, 397-403.
- Lin C.Y., Duan H. and Mazzone T. (1999): *Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E*. J Lipid Res 40, 1618-27.
- Lohmueller K.E., Pearce C.L., Pike M., Lander E.S. and Hirschhorn J.N. (2003): *Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease*. Nat Genet 33, 177-82.
- MacKeown T. (1976). *The role of medicine : dream, mirage, or nemesis ?* London, Nuffield Provincial Hospitals Trust.
- Mahley R.W. and Rall S.C., Jr. (2000): *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet 1, 507-37.
- Majewski J., Schultz D.W., Weleber R.G., Schain M.B., Edwards A.O. et al. (2003): *Age-related macular degeneration--a genome scan in extended families*. Am J Hum Genet 73, 540-50.
- Maller J.B., Fagerness J.A., Reynolds R.C., Neale B.M., Daly M.J. et al. (2007): *Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration*. Nat Genet 39, 1200-1.
- Mayer B., Erdmann J. and Schunkert H. (2007): *Genetics and heritability of coronary artery disease and myocardial infarction*. Clin Res Cardiol 96, 1-7.
- McKay G.J., Clarke S., Hughes A., McConnell V., Schultz D.W. et al. (2004): *A novel diagnostic test detects a low frequency of the hemicentin Gln5345Arg variant among Northern Irish age related macular degeneration patients*. Mol Vis 10, 682-7.
- Ng T.K., Chen L.J., Liu D.T., Tam P.O., Chan W.M. et al. (2008): *Multiple gene polymorphisms in the complement factor h gene are associated with exudative age-related macular degeneration in chinese*. Invest Ophthalmol Vis Sci 49, 3312-7.
- Park K.H., Ryu E., Tosakulwong N., Wu Y. and Edwards A.O. (2009): *Common variation in the SERPING1 gene is not associated with age-related macular degeneration in two independent groups of subjects*. Mol Vis 15, 200-7.
- Patil N., Berno A.J., Hinds D.A., Barrett W.A., Doshi J.M. et al. (2001): *Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21*. Science 294, 1719-23.



- Penfold P., Killingsworth M. and Sarks S. (1984): *An ultrastructural study of the role of leucocytes and fibroblasts in the breakdown of Bruch's membrane*. Aust J Ophthalmol 12, 23-31.
- Penfold P.L., Killingsworth M.C. and Sarks S.H. (1985): *Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 223, 69-76.
- Penfold P.L., Killingsworth M.C. and Sarks S.H. (1986): *Senile macular degeneration. The involvement of giant cells in atrophy of the retinal pigment epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci 27, 364-71.
- Provis J.M., Penfold P.L., Cornish E.E., Sandercoe T.M. and Madigan M.C. (2005): *Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration*. Clin Exp Optom 88, 269-81.
- Ramos M.C., Matias S., Artiga M.J., Pozueta J., Sastre I. et al. (2005): *Neuronal specific regulatory elements in apolipoprotein E gene proximal promoter*. Neuroreport 16, 1027-30.
- Reich D.E. and Lander E.S. (2001): *On the allelic spectrum of human disease*. Trends Genet 17, 502-10.
- Risch N. (1990): *Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models*. Am J Hum Genet 46, 222-8.
- Rivera A., Fisher S.A., Fritsche L.G., Keilhauer C.N., Lichtner P. et al. (2005): *Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk*. Hum Mol Genet 14, 3227-36.
- Ross R.J., Bojanowski C.M., Wang J.J., Chew E.Y., Rochtchina E. et al. (2007): *The LOC387715 polymorphism and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples*. Invest Ophthalmol Vis Sci 48, 1128-32.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977): *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 74, 5463-7.
- Schaumberg D.A., Hankinson S.E., Guo Q., Rimm E. and Hunter D.J. (2007): *A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors*. Arch Ophthalmol 125, 55-62.
- Schick J.H., Iyengar S.K., Klein B.E., Klein R., Reading K. et al. (2003): *A whole-genome screen of a quantitative trait of age-related maculopathy in sibships from the Beaver Dam Eye Study*. Am J Hum Genet 72, 1412-24.
- Schmidt S., Haines J.L., Postel E.A., Agarwal A., Kwan S.Y. et al. (2005): *Joint effects of smoking history and APOE genotypes in age-related macular degeneration*. Mol Vis 11, 941-9.
- Schmidt S., Hauser M.A., Scott W.K., Postel E.A., Agarwal A. et al. (2006): *Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration*. Am J Hum Genet 78, 852-64.
- Schmidt S., Klaver C., Saunders A., Postel E., De La Paz M. et al. (2002): *A pooled case-control study of the apolipoprotein E (APOE) gene in age-related maculopathy*. Ophthalmic Genet 23, 209-23.
- Schmidt S., Saunders A.M., De La Paz M.A., Postel E.A., Heinis R.M. et al. (2000): *Association of the apolipoprotein E gene with age-related macular degeneration: possible effect modification by family history, age, and gender*. Mol Vis 6, 287-93.
- Scholl H.P., Charbel Issa P., Walier M., Janzer S., Pollok-Kopp B. et al. (2008): *Systemic complement activation in age-related macular degeneration*. PLoS ONE 3, e2593.

- Schultz D.W., Klein M.L., Humpert A., Majewski J., Schain M. *et al.* (2003): *Lack of an association of apolipoprotein E gene polymorphisms with familial age-related macular degeneration.* Arch Ophthalmol 121, 679-83.
- Schultz D.W., Klein M.L., Humpert A.J., Luzier C.W., Persun V. *et al.* (2003): *Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family.* Hum Mol Genet 12, 3315-23.
- Schultz D.W., Weleber R.G., Lawrence G., Barral S., Majewski J. *et al.* (2005): *HEMICENTIN-1 (FIBULIN-6) and the 1q31 AMD locus in the context of complex disease: review and perspective.* Ophthalmic Genet 26, 101-5.
- Seddon J.M., Cote J., Page W.F., Aggen S.H. and Neale M.C. (2005): *The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences.* Arch Ophthalmol 123, 321-7.
- Seddon J.M., Francis P.J., George S., Schultz D.W., Rosner B. *et al.* (2007): *Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration.* JAMA 297, 1793-800.
- Seddon J.M., Santangelo S.L., Book K., Chong S. and Cote J. (2003): *A genomewide scan for age-related macular degeneration provides evidence for linkage to several chromosomal regions.* Am J Hum Genet 73, 780-90.
- Seitsonen S., Lemmela S., Holopainen J., Tommila P., Ranta P. *et al.* (2006): *Analysis of variants in the complement factor H, the elongation of very long chain fatty acids-like 4 and the hemicentin 1 genes of age-related macular degeneration in the Finnish population.* Mol Vis 12, 796-801.
- Shimano H., Yamada N., Katsuki M., Yamamoto K., Gotoda T. *et al.* (1992): *Plasma lipoprotein metabolism in transgenic mice overexpressing apolipoprotein E. Accelerated clearance of lipoproteins containing apolipoprotein B.* J Clin Invest 90, 2084-91.
- Shuler R.K., Jr., Hauser M.A., Caldwell J., Gallins P., Schmidt S. *et al.* (2007): *Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism.* Arch Ophthalmol 125, 63-7.
- Silvestri G., Johnston P.B. and Hughes A.E. (1994): *Is genetic predisposition an important risk factor in age-related macular degeneration?* Eye 8 ( Pt 5), 564-8.
- Simonelli F., Margaglione M., Testa F., Cappucci G., Manitto M.P. *et al.* (2001): *Apolipoprotein E polymorphisms in age-related macular degeneration in an Italian population.* Ophthalmic Res 33, 325-8.
- Sivaprasad S. and Chong N.V. (2006): *The complement system and age-related macular degeneration.* Eye 20, 867-72.
- Skerka C., Lauer N., Weinberger A.A., Keilhauer C.N., Suhnel J. *et al.* (2007): *Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration.* Mol Immunol 44, 3398-406.
- Smith D.J. and Lusk A.J. (2002): *The allelic structure of common disease.* Hum Mol Genet 11, 2455-61.
- Souied E.H., Benlian P., Amouyel P., Feingold J., Lagarde J.P. *et al.* (1998): *The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration.* Am J Ophthalmol 125, 353-9.
- Spencer K.L., Hauser M.A., Olson L.M., Schmidt S., Scott W.K. *et al.* (2007): *Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration.* Hum Mol Genet 16, 1986-92.
- Spencer K.L., Olson L.M., Anderson B.M., Schnetz-Boutaud N., Scott W.K. *et al.* (2008): *C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration.* Hum Mol Genet 17, 1821-4.

- Stone E.M., Braun T.A., Russell S.R., Kuehn M.H., Lotery A.J. *et al.* (2004): *Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration.* N Engl J Med 351, 346-53.
- Stranger B.E., Nica A.C., Forrest M.S., Dimas A., Bird C.P. *et al.* (2007): *Population genomics of human gene expression.* Nat Genet 39, 1217-24.
- Tanimoto S., Tamura H., Ue T., Yamane K., Maruyama H. *et al.* (2007): *A polymorphism of LOC387715 gene is associated with age-related macular degeneration in the Japanese population.* Neurosci Lett 414, 71-4.
- Thakkinstian A., Bowe S., McEvoy M., Smith W. and Attia J. (2006): *Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis.* Am J Epidemiol 164, 813-22.
- The International HapMap Consortium (2005): *A haplotype map of the human genome.* Nature 437, 1299-320.
- The Wellcome Trust Case Control Consortium (2007): *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.* Nature 447, 661-78.
- Tomany S.C., Wang J.J., Van Leeuwen R., Klein R., Mitchell P. *et al.* (2004): *Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents.* Ophthalmology 111, 1280-7.
- Town T., Paris D., Fallin D., Duara R., Barker W. *et al.* (1998): *The -491A/T apolipoprotein E promoter polymorphism association with Alzheimer's disease: independent risk and linkage disequilibrium with the known APOE polymorphism.* Neurosci Lett 252, 95-8.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J. *et al.* (2001): *The sequence of the human genome.* Science 291, 1304-51.
- Weeks D.E., Conley Y.P., Mah T.S., Paul T.O., Morse L. *et al.* (2000): *A full genome scan for age-related maculopathy.* Hum Mol Genet 9, 1329-49.
- Weeks D.E., Conley Y.P., Tsai H.J., Mah T.S., Rosenfeld P.J. *et al.* (2001): *Age-related maculopathy: an expanded genome-wide scan with evidence of susceptibility loci within the 1q31 and 17q25 regions.* Am J Ophthalmol 132, 682-92.
- Weeks D.E., Conley Y.P., Tsai H.J., Mah T.S., Schmidt S. *et al.* (2004): *Age-related maculopathy: a genomewide scan with continued evidence of susceptibility loci within the 1q31, 10q26, and 17q25 regions.* Am J Hum Genet 75, 174-89.
- Yang Z., Camp N.J., Sun H., Tong Z., Gibbs D. *et al.* (2006): *A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration.* Science 314, 992-3.
- Yang Z., Stratton C., Francis P.J., Kleinman M.E., Tan P.L. *et al.* (2008): *Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration.* N Engl J Med 359, 1456-63.
- Yates J.R., Sepp T., Matharu B.K., Khan J.C., Thurlby D.A. *et al.* (2007): *Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration.* N Engl J Med 357, 553-61.
- Yu C.E., Seltman H., Peskind E.R., Galloway N., Zhou P.X. *et al.* (2007): *Comprehensive analysis of APOE and selected proximate markers for late-onset Alzheimer's disease: patterns of linkage disequilibrium and disease/marker association.* Genomics 89, 655-65.
- Zarbin M.A. (2004): *Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration.* Arch Ophthalmol 122, 598-614.
- Zarepari S., Reddick A.C., Branham K.E., Moore K.B., Jessup L. *et al.* (2004): *Association of apolipoprotein E alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in a large cohort from a single center.* Invest Ophthalmol Vis Sci 45, 1306-10.

- Zhang H., Morrison M.A., Dewan A., Adams S., Andreoli M. *et al.* (2008): *The NEI/NCBI dbGAP database: genotypes and haplotypes that may specifically predispose to risk of neovascular age-related macular degeneration*. BMC Med Genet 9, 51.
- Zhang J., Sun X., Qian Y., LaDuca J.P. and Maquat L.E. (1998): *At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation*. Mol Cell Biol 18, 5272-83.
- Zhou J., Kim S.R., Westlund B.S. and Sparrow J.R. (2009): *Complement activation by bisretinoid constituents of RPE lipofuscin*. Invest Ophthalmol Vis Sci 50, 1392-9.

## 6 Zusammenfassung

Die AMD ist eine komplexe Erkrankung, welche in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Ursachen gesetzlich anerkannter Blindheit zählt. Zum Aufspüren ihrer genetischen Ursachen kommen bisher hauptsächlich drei Ansätze für Fall/Kontroll-Assoziationsstudien in Frage: Kandidatengestudien, Feinkartierungen nach familienbasierten Kopplungsanalysen und genomweite Studien. In der vorliegenden Arbeit wurden die ersten beiden Ansätze verfolgt. Als Kandidatengene wurden die Gene *APOE* und *HMCN1* auf vermeintlich schwache Effekte untersucht. Hierbei zeigte sich, dass keine Assoziation zwischen häufigen als auch seltenen *HMCN1*-Varianten und der AMD beobachtet werden konnte. Demgegenüber konnten die bereits mehrfach publizierten, schwachen Effekte der kodierenden *APOE*-Varianten auf das AMD-Risiko bestätigt werden ( $P < 0.05$ ). Ferner gelang es in der Analyse des gesamten *APOE*-Locus eine Korrelation zwischen regulatorischen und kodierenden *APOE*-Varianten herzustellen. Diese deutete das Vorhandensein einer differenziellen Expression von mRNA- und Proteinisoformen an, welche für deren Assoziation mit der AMD von Bedeutung sein könnte.

In gemeinsamen Studien des „International AMD Genetics Consortiums“ wurden die beiden Kandidaten *TLR3* und *SERPING1*, die in publizierten Arbeiten als AMD Suszeptibilitätsgene gefunden worden waren, untersucht. Die Ergebnisse unserer internationalen Replikationsstudien, die 1.080 GA-Patienten und 2.669 Kontrollpersonen (*TLR3*) bzw. 4.881 AMD-Patienten und 2.842 Kontrollpersonen (*SERPING1*) umfassten, zeigten keinerlei Assoziation der jeweilig untersuchten Variante mit der AMD. Diese Arbeiten zeigen, dass selbst Primärpublikationen mit begleitenden Replikationen, insbesondere bei schwachen bis moderaten Effekten, kritisch zu hinterfragen sind. Hieraus ergibt sich die Forderung nach mehreren großen, unabhängigen Replikationsstudien.

In einem weiteren Ansatz wurde die mittels familienbasierten AMD-Kopplungsanalysen und einer darauf basierenden Meta-Analyse identifizierte 22 Mb-Kandidatenregion auf Chromosom 10q23.33–10qter schrittweise auf eine 23 kb-große Region eingegrenzt. Diese umfasst die Genorte für *ARMS2* und *HTRA1*. Eine Resequenzierung des einzigen Risikohaplotyps führte zur Identifizierung von insgesamt 15 Hoch-Risikovarianten in *ARMS2* und *HTRA1*, wobei diese mit annähernd gleicher Wahrscheinlichkeit als kausale Varianten in Frage kommen. Ein Vergleich der beobachteten Assoziationsstärke dieser Region mit der

CFH-Y402H-Variante von Chromosom 1q31, dem erstes Hauptgen der AMD-Suszeptibilität, lässt außerdem den Schluss zu, dass *ARMS2/HTRA1* nach *CFH* einen zweiten und gleichwertigen hauptverantwortlichen AMD-Suszeptibilitätslocus darstellt.

Von den 15 detektierten Risikovarianten der *ARMS2/HTRA1*-Region ist eine Indel-Variante (c.\*372\_815del443ins54) im 3'-nicht-translatierten Bereich von *ARMS2* von besonderem Interesse, da sie mit einer mRNA-Destabilisierung des *ARMS2*-Transkripts einhergeht. Allerdings konnte die bislang unbekannte, biologische Funktion von *ARMS2*, das in der Retina lokalisiert ist, nicht weiter aufgeklärt werden.

Zusätzlich zu den genetischen Analysen wurde im Rahmen von Kooperationsprojekten die Rolle des Komplementsystems bei der AMD untersucht. Hierbei zeigte sich bei den AMD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen eine gesteigerte, systemische Komplementaktivierung, welche zudem unabhängig vom AMD-Status bei Trägern der CFH-His402-Risikovariante beobachtet werden konnte. Untersuchungen zu den funktionellen Auswirkungen der CFH-Y402H-Variante erhärteten deren kausale Rolle bei der AMD und zeigen, dass die His402-Risikovarante mit reduzierten Heparin- und CRP-Bindungseigenschaften und dadurch mit einer gesteigerten Komplementaktivität einhergeht.

Anhand der vorliegenden Untersuchungen zu den genetischen Suszeptibilitätsfaktoren der AMD wird erkennbar, dass deren Spektrum von einigen wenigen hauptverantwortlichen Genen bis zu einer Vielzahl von Genen mit kleinen Beiträgen reicht. Letztere Gene lassen sich allerdings nur anhand großangelegter Studien mit geeigneten Replikationskonzepten zuverlässig detektieren. Ausgestattet mit genügend Aussagekraft könnten diese Studien weitere Assoziationen zwischen der AMD und bisher unbekannten Signalwegen aufzuzeigen. Es bleibt daher zu hoffen, dass diese zusammen mit den aufkommenden, funktionellen Studien der bereits bekannten Suszeptibilitätsgene weitere Einblicke in die AMD-Pathogenese liefern, welche für die innovative und gezielte Therapieentwicklung dringend benötigt werden.

## 7 Summary

AMD is a complex disorder which represents one the most common causes of legal blindness in the industrialized countries. There are mainly three approaches of case-control association studies available to detect the underlying genetic causes: candidate gene studies, fine-mapping studies coupled with family-based LD analysis and genome-wide association studies. In the present work, the first two approaches were applied. In the category “candidate genes”, *APOE* and *HMCN1* were analyzed with regard to their supposedly weak effects on disease susceptibility. In doing so, no association could be observed between common and rare variants of the *HMCN1* gene and AMD. In contrast, the manifold replicated effects of the coding *APOE* variants on AMD risk were confirmed in our study ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the analysis of the entire *APOE* locus revealed a correlation between regulatory and coding *APOE* variants. This suggests the existence of a differential expression of mRNA and protein isoforms which might be essential for their association with AMD.

In our efforts to replicate the associations of the two putative AMD susceptibility genes, namely *TLR3* and *SERPING1*, we collaborated with the “International AMD Genetics Consortium”. Our findings in the international replication studies that comprised 1,080 GA patients and 2,669 controls (*TLR3*) and 4,881 AMD patients and 2,842 controls (*SERPING1*) respectively, revealed no association between the corresponding variants and AMD. Our data show that even primary association studies with accompanied replication studies should be critically scrutinized especially when dealing with weak or moderate effects. Hence, the requirement for several large, independent replication studies is highly suggested.

Based on LD analyses of AMD families and a subsequent meta-analysis, the identified positional 22 Mb candidate region on chromosome 10q23.33–10qter was refined to a 23 kb region. This region encompasses the genes *ARMS2* and *HTRA1*. Resequencing of the single AMD risk haplotype led to the identification of 15 high risk variants in *ARMS2* and *HTRA1* with equal probabilities of representing the underlying causal variant. A comparison of the observed association strength within this region with the CFH Y402H variant on chromosome 1q31 gave rise to the conclusion that in addition to the *CFH* gene *ARMS2/HTRA1* represents a second major AMD susceptibility locus.

Of the 15 risk variants detected in the *ARMS2/HTRA1* region, an indel variant (c.\*372\_815del443ins54) in the 3' untranslated region of *ARMS2* was of particular interest, as it is accompanied by a destabilization of the *ARMS2* mRNA transcript. However, the biological function of *ARMS2* which is localizing to the retina is still unknown.

In addition to the genetic analysis, the role of the complement system in AMD was investigated as part of two cooperation projects. Here, increased systemic complement activation was observed in AMD patients compared to control subjects, which was also observed for the CFH His402 risk variant regardless of the individuals' AMD status. Investigations on the functional role of the CFH Y402H variant confirmed its causal role in AMD and demonstrated that the risk variant leads to reduced heparin and CRP binding properties and thus to an increased complement activity.

The current studies on the genetic causes of AMD suggest that the spectrum of genetic contributions ranges from a few genes with major contributions to a large number of genes with small contributions. However, the latter group of genes can only be reliably detected in large-scale AMD studies with appropriate replication concepts. Provided with sufficient power, these studies might identify associations between AMD and yet unknown signal pathways. There is the expectation that these together with the upcoming functional studies from already known susceptibility genes will shed new light on the AMD pathogenesis urgently needed for novel developments in innovative and targeted therapies.



## 8 Lebenslauf

**Lars Fritsche**

Diplom-Biologe

### FAMILIENSTAND

### PROMOTION

seit 01/2005      Institut für Humangenetik, Universität Regensburg  
„Untersuchungen zu den genetischen Ursachen der altersabhängigen  
Makuladegeneration (AMD)“

### STUDIUM

10/1999 – 08/2004      Studium der Biologie, Universität Regensburg  
Hauptfach:    Genetik  
1. Nebenfach: Bioinformatik  
2. Nebenfach: Zoologie

### DIPLOMARBEIT

Lehrstuhl für Genetik, Universität Regensburg  
„Untersuchungen zur homologen Rekombination bei  
*Chlamydomonas reinhardtii* und zum heterologen Genaustausch“

### ZIVILDienst

07/1998 – 07/1999      Rettungsdienst beim Bayerischen Roten Kreuz, Lindenberg

### SCHULE

1988 – 1998              Bodensee-Gymnasium Lindau/B, Abitur 1998

### ZUSATZQUALIFIKATIONEN

seit 06/2006              Design und Etablierung von RetChip 1.0, einem Array-basierten  
Werkzeug für die Diagnostik von retinalen Erkrankungen  
(Institut für Humangenetik, Universität Regensburg)

10/2005 – 12/2005      Hospitation am Institut für Medizinische Informatik und Statistik des  
Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel)

### AUSZEICHNUNGEN

09/2009                  Makula-Forschungspreis 2009 zur Verhütung von Blindheit der Pro  
Retina Deutschland e.V.

## 9 Publikationen und Kongressbeiträge

Im Folgenden sind Publikationen und Kongressbeiträge aufgelistet, die im Rahmen der vorliegenden experimentellen Dissertation erstellt wurden.

### 9.1 Publikationen

#### 9.1.1 Erstautorenschaften

**Fritsche L.G.**, Loenhardt T., Janssen A., Fisher S.A., Rivera A., Keilhauer C.N. and Weber B.H. (2008): *Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA*. Nat Genet 40, 892-6.

**Fritsche L.G.**, Freitag-Wolf S., Bettecken T., Meitinger T., Keilhauer C.N., Krawczak M. and Weber B.H. (2009): *Age-related macular degeneration and functional promoter and coding variants of the apolipoprotein E gene*. Hum Mutat 30, 1048-53.

#### 9.1.2 Koautorenschaften

Rivera A., Fisher S.A., **Fritsche L.G.**, Keilhauer C.N., Lichtner P., Meitinger T. and Weber B.H. (2005): *Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk*. Hum Mol Genet 14, 3227-36.

Fisher S.A., Rivera A., **Fritsche L.G.**, Babadjanova G., Petrov S. and Weber B.H. (2007): *Assessment of the contribution of CFH and chromosome 10q26 AMD susceptibility loci in a Russian population isolate*. Br J Ophthalmol 91, 576-8.

Fisher S.A., Rivera A., **Fritsche L.G.**, Keilhauer C.N., Lichtner P., Meitinger T., Rudolph G. and Weber B.H. (2007): *Case-control genetic association study of fibulin-6 (FBLN6 or HMCN1) variants in age-related macular degeneration (AMD)*. Hum Mutat 28, 406-13.

Skerka C., Lauer N., Weinberger A.A., Keilhauer C.N., Suhnel J., Smith R., Schlotzer-Schrehardt U., **Fritsche L.G.**, Heinen S., Hartmann A., Weber B.H. and Zipfel P.F. (2007): *Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration*. Mol Immunol 44, 3398-406.

Scholl H.P., Charbel Issa P., Walier M., Janzer S., Pollok-Kopp B., Borncke F., **Fritsche L.G.**, Chong N.V., Fimmers R., Wienker T., Holz F.G., Weber B.H. and Oppermann M. (2008): *Systemic complement activation in age-related macular degeneration*. PLoS ONE 3, e2593.

Allikmets R., Bergen A.A., Dean M., Guymer R.H., Hageman G.S., Klaver C.C., Stefansson K., Weber B.H., Merriam J.E., Smith R.T., Barile G.R., Gehrs K.M., Hancox L.S., Miller N.J., Howard M.L., de Jong P.T., Baas D., Ho L., Vingerling J.R., Uitterlinden A.G., **Fritsche L.G.**, Keilhauer C.N., Baird P.N., Sawitzke J., Magnusson K.P., Thorleifsson G. and Thorsteinsdottir U. (2009): *Geographic atrophy in age-related macular degeneration and TLR3*. N Engl J Med 360, 2252-4.

- Allikmets R., Dean M., Hageman G.S., Baird P.N., Klaver C.C., Bergen A.A., Weber B.H., Merriam J.E., Smith R.T., Barile G.R., Sawitzke J., Gehrs K.M., Hageman J.L., Miller N.J., Howard M.L., Guymer R.H., Richardson A., Ho L., Vingerling J.R., Uitterlinden A.G., de Jong P.T., Baas D., **Fritsche L.G.** and Keilhauer C.N. (2009): *The SERPING1 gene and age-related macular degeneration*. Lancet 374, 875-6.
- Scholl H.P., Fleckenstein M., **Fritsche L.G.**, Schmitz-Valckenberg S., Gobel A., Adrion C., Herold C., Keilhauer C.N., Mackensen F., Mossner A., Pauleikhoff D., Weinberger A.W., Mansmann U., Holz F.G., Becker T. and Weber B.H. (2009): *CFH, C3 and ARMS2 are significant risk loci for susceptibility but not for disease progression of geographic atrophy due to AMD*. PLoS One 4, e7418.

### 9.1.3 Patente

- Fritsche L.G.**, Loenhardt T., Rivera A., and Weber B.H. *Indel-Variante im ARMS2-Gen und Suszeptibilität für altersabhängige Makuladegeneration (AMD)*. Universität Regensburg. Erfindermeldung 27.08.08

## 9.2 Kongressbeiträge

### 9.2.1 Vorträge

**Fritsche L.G.**

Heidelberg: 11.3.2006

17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 8.–11.03.2006, Heidelberg  
*Association of apolipoprotein E (APOE) polymorphisms with age-related macular degeneration in a large German case-control study*

**Fritsche L.G.**

Potsdam: 7.4.2006

2. Pro Retina Research-Colloquium, 7.–8.4.2006, Potsdam  
*Susceptibility factors for age-related macular degeneration (AMD)*

**Fritsche L.G.**

Bonn: 9.3.2007

18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 7.–10.3.2007, Bonn  
*250K SNP genome scan in age-related macular degeneration (AMD)*

**Fritsche L.G.**

Berlin: 21.9.2007

105. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 20.–23.9.2007, Berlin  
*Genetik der AMD – „Major and minor susceptibility factors“*

**Fritsche L.G.**

Maastricht: 22.1.2008

1. Workshop Affymetrix Resequencing CHIPs, 22.–23.1.2008, Maastricht, Niederlande  
*RetChip1.0: A novel diagnostic tool for an array-based mutational analysis of retinal degeneration*

**Fritsche L.G.**

Potsdam: 29.3.2008

4. Pro Retina Research-Colloquium, 28.–29.3.2008, Potsdam  
*New insights into chromosome 10q26-associated AMD*

**Fritsche L.G.**

Tutzing: 14.5.2009

8. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Chipdiagnostik, 14.–15.5.2009, Tutzing  
*RetChip 1.0: ein neues chip-basiertes Werkzeug für die Diagnostik von retinalen Erkrankungen*

**Fritsche L.G., Fiebig B.S.**

München: 14.9.2009

Fachtagung Molekulare Diagnostik, München  
*Entwicklung und Einsatz einer Chip-basierten Diagnostik retinaler Erkrankungen*

### 9.2.2 Poster

**Fritsche L.G.**, Rivera A., Keilhauer C.N., Weber B.H.

1. Pro Retina Research-Colloquium, 8.–9.4.2005, Potsdam

*Assessing the “Common-Disease – Common Variant” Hypothesis in Age-related Macular Degeneration (AMD)*

**Fritsche L.G.**, Weber B.H.

3. Pro Retina Research-Colloquium, 8.–9.4.2007, Potsdam

*RetChip1.0 – A novel diagnostic tool for a chip-based analysis of retinal degenerations*

## 10 Anhang

Im Nachfolgenden sind die in der Dissertation zusammengefassten Originalarbeiten, entsprechend ihrer Reihenfolge im Ergebnisteil, beigelegt.

- Fritsche L.G., Freitag-Wolf S., Bettecken T., Meitinger T., Keilhauer C.N. *et al.* (2009): *Age-related macular degeneration and functional promoter and coding variants of the apolipoprotein E gene*. Hum Mutat 30, 1048-53.  
<http://dx.doi.org/10.1002/humu.20957>
- Fisher S.A., Rivera A., Fritsche L.G., Keilhauer C.N., Lichtner P. *et al.* (2007): *Case-control genetic association study of fibulin-6 (FBLN6 or HMCN1) variants in age-related macular degeneration (AMD)*. Hum Mutat 28, 406-13.  
<http://dx.doi.org/10.1002/humu.20464>
- Allikmets R., Bergen A.A., Dean M., Guymer R.H., Hageman G.S. *et al.* (2009): *Geographic atrophy in age-related macular degeneration and TLR3*. N Engl J Med 360, 2252-4. <http://dx.doi.org/10.1056%2FNEJMc082233>
- Allikmets R., Dean M., Hageman G.S., Baird P.N., Klaver C.C. *et al.* (2009): *The SERPING1 gene and age-related macular degeneration*. Lancet 374, 875-6.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61618-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61618-4)
- Rivera A., Fisher S.A., Fritsche L.G., Keilhauer C.N., Lichtner P. *et al.* (2005): *Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk*. Hum Mol Genet 14, 3227-36. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi353>
- Fritsche L.G., Loenhardt T., Janssen A., Fisher S.A., Rivera A. *et al.* (2008): *Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA*. Nat Genet 40, 892-6. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.170>
- Fisher S.A., Rivera A., Fritsche L.G., Babadjanova G., Petrov S. *et al.* (2007): *Assessment of the contribution of CFH and chromosome 10q26 AMD susceptibility loci in a Russian population isolate*. Br J Ophthalmol 91, 576-8.  
<http://dx.doi.org/10.1136/bjo.2006.105577>
- Scholl H.P., Charbel Issa P., Walier M., Janzer S., Pollok-Kopp B. *et al.* (2008): *Systemic complement activation in age-related macular degeneration*. PLoS ONE 3, e2593.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002593>
- Skerka C., Lauer N., Weinberger A.A., Keilhauer C.N., Suhnel J. *et al.* (2007): *Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration*. Mol Immunol 44, 3398-406.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2007.02.012>

## **Danksagung**

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen einen herzlichen Dank. Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Betreuer Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber richten, der mir das spannende Thema meiner Doktorarbeit zur Verfügung stellte und mir meine wissenschaftlichen Arbeiten ermöglichte. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, Erfahrungen sowie vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben, sowie meine wissenschaftliche Entwicklung und Verwirklichung immens gefördert.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis für die Vertretung meiner Doktorarbeit in der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin und für das Erstellen des Erstgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Stephan Schneuwly und Herrn Prof. Dr. Herbert Tschochner bedanke ich mich für ihre Bereitschaft die Aufgaben des dritten Prüfers bzw. des Vorsitzes im Prüfungsausschuss zu übernehmen.

Danke sage ich auch den zahlreichen Kooperationspartnern, die viele der vorgestellten Arbeiten begleitet haben: insbesondere Herrn Prof. Dr. Michael Krawczak, Frau Dr. Sandra Freitag-Wolf und Frau Dr. Sheila Fisher, die mir den Einstieg in die Welt der Statistik und der Epidemiologie erleichtert haben; Frau Dr. Claudia von Strachwitz für ihre unermüdliche Sammlung und Charakterisierung von AMD-Patienten und Kontrollpersonen; und auch den Probanden aller Studien, ohne deren freiwillige Teilnahme diese Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein großer Dank geht außerdem an alle meine Kollegen: allen voran Andrea Milenkovic, Kerstin Meier und Jürgen Kaschkötö, deren Zusammenarbeit einen wichtigen Bestandteil bei der Erstellung meiner Doktorarbeit darstellte; aber auch namentlich den Espresso-Club-Mitgliedern Regina Gellner, Karin Weigelt, Ulrike Friedrich, Michael Saugspier, Marcus Karlstetter und Saskia Herbst, die mir täglich zu beständiger Wachsamkeit und ironischen Späßen verholfen haben.

Darüber hinaus gilt ein großes Dankeschön meinen Freunden: insbesondere Markus Neumeier, Markus Haindl, Peter Jäckel, Elmar Schilling, sowie Christoph Seitz, die mich seit meinem Studium mit ihrem abenteuerlichen Fachwissen auf fachfremden Abenteuern begleitet und mich immer bei Laune gehalten haben; meinem Leukapherese-Leidensgenossen Lasse Schmidt van Hülst für die kurzweiligen Ablenkungen von der Biologie; als auch den Gaumenfreu(n)den des kleinen aber feinen Kochzirkels, Julia Hoellenriegel und Andreas Janßen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium erst ermöglicht haben, deren uneingeschränktes Vertrauen in mich mir stets Rückhalt gab und denen diese Arbeit auch gewidmet ist.

Zu guter Letzt geht mein ganz spezieller Dank an meine Freundin Johanna Förster, die immer für mich da war, die mich wieder aufgebaut hat, wenn ich an mir gezweifelt habe, die sich auch mit mir freuen konnte, wenn es das Glück zu gut mit mir meinte und die immer an mich geglaubt hat.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der obigen Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Regensburg, 27. Oktober 2009

---

Lars Fritsche